

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190495** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.02.03

(22) Дата подачи заявки
2020.04.26

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-L1 ЧЕЛОВЕКА

(31) PCT/CN2019/084468

(32) 2019.04.26

(33) CN

(86) PCT/CN2020/087019

(87) WO 2020/216379 2020.10.29

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

(72) Изобретатель:
**Фан Лэй, Ян Юаньюань, Ван Чжэньи,
Гуо Бинши, Цуй Фэйфэй (CN)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Предложены полноразмерные антитела против PD-L1 человека или их фрагменты. В различных примерах указанные антитела или их фрагменты содержат VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, выбранные из групп последовательностей SEQ ID NO: 35-42, SEQ ID NO: 43-51, SEQ ID NO: 52-66, SEQ ID NO: 67-79, SEQ ID NO: 80-88 и SEQ ID NO: 89-102 соответственно, или варианты каждой из указанных последовательностей. Кроме того, предложены способы применения указанных антител или их фрагментов для лечения и диагностики заболеваний, таких как рак и инфекционные заболевания.

202190495

A1

A1

202190495

АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-L1 ЧЕЛОВЕКА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Антитела, специфичные по отношению к лиганду-1 белка запрограммированной гибели клеток (PD-L1), также известному как кластер дифференцировки 274 (CD274) или гомолог-1 В7 (В7-Н1), используют для лечения рака и в других вариантах клинического применения. PD-L1 представляет собой трансмембранный белок 1 типа размером 40 кДа, предположительно играющий значительную роль в подавлении иммунной системы при специфических событиях, например, беременности, аллотрансплантации тканей, аутоиммунном заболевании и других болезненных состояниях, например, гепатите. При связывании PD-L1 с PD-1 или В7.1 происходит передача ингибиторного сигнала, который снижает пролиферацию CD8⁺ Т-клеток в лимфатических узлах; в дополнение к этому, PD-1 также способен контролировать аккумуляцию специфичных в отношении чужеродных антигенов Т-клеток в лимфатических узлах за счет апоптоза, который дополнительно опосредован понижающей регуляцией гена Bcl-2.

[0002] Также обнаружена перспективность ингибирования PD-L1 для лечения инфекционных заболеваний, в дополнение к лечению рака. В модели внутриклеточной инфекции на мышах *L. monocytogenes* индуцировал экспрессию белка PD-L1 в Т-клетках, NK-клетках и макрофагах. Блокада PD-L1 (например, с применением блокирующих антител) приводила к увеличению смертности у инфицированных мышей. Блокада снижала продукцию ФНО-α и оксида азота макрофагами, снижала продукцию гранзима В NK-клетками и уменьшала пролиферацию специфичных в отношении антигена *L. monocytogenes* CD8 Т-клеток (но не CD4 Т-клеток). Эти данные предполагают, что PD-L1 действует в качестве положительной костимулирующей молекулы при внутриклеточной инфекции.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Согласно настоящему изобретению предложены антитела против PD-L1, обладающие высокой аффинностью связывания с белками PD-L1 человека и способные эффективно блокировать взаимодействие между PD-L1 и его рецептором PD-1. Идентифицированные антитела представляют собой полностью человеческие антитела

и предполагается, что указанные антитела обладают улучшенными характеристиками по сравнению с гуманизированными антителами при вариантах клинического применения.

[0004] В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело против PD-L1 или его фрагмент. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:35-42 и их вариантов, имеющих одну или две аминокислотные замены, VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:43-51 и их вариантов, имеющих одну или две аминокислотные замены, VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:52-66 и их вариантов, имеющих одну или две аминокислотные замены, VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:67-79 и их вариантов, имеющих одну или две аминокислотные замены, VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:80-88 и их вариантов, имеющих одну или две аминокислотные замены, и VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:89-102 и их вариантов, имеющих одну или две аминокислотные замены.

[0005] В одном варианте реализации указанный VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, указанный VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, 135, 136, 137, 142 или 143, указанный VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63, указанный VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, указанный VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, и указанный VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97. В конкретном варианте реализации VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46.

[0006] В типичном антителе или фрагменте VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, 124, 126, 127, 128, 130, 140 или 145, и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24 или 125, а также их варианты. Например, VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:124 или первую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:124 (и в то же время сохраняющую

указанные CDR), и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125 или вторую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:125 (и в то же время сохраняющую указанные CDR).

[0007] Кроме того, предложена композиция, содержащая антитело или его фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель. Кроме того, предложены один или более полинуклеотидов, кодирующих антитело или его фрагмент, выделенная клетка, содержащая один или более полинуклеотидов, кодирующих антитело или его фрагмент.

[0008] Кроме того, предложены способы лечения и варианты применения. В одном варианте реализации предложен способ лечения рака или инфекции у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение указанному пациенту эффективного количества антитела или его фрагмента согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации рак представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах реализации 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. В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает введение пациенту второго агента для лечения рака. Согласно некоторым вариантам реализации, указанная инфекция представляет собой вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию или паразитарную инфекцию.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0009] На Фиг. 1 показаны профили связывания PD-L1 протестированными антителами.

[0010] На Фиг. 2 показана активность антител в отношении блокирования PD1/PDL1-опосредованной NF-AT-люциферазной активности.

[0011] На Фиг. 3 показано, что все протестированные антитела устраняли PD1/PDL1-опосредованное ингибирование NF-AT-люциферазы в зависимости от дозы.

[0012] На Фиг. 4 показаны результаты функциональных тестов для мутантных антител.

[0013] На Фиг. 5 представлены результаты анализа аффинности B12-01 на основе клеток по сравнению с Tecentriq и авелумабом.

[0014] На Фиг. 6 показано, что B12-01 обладает аффинностью к PD-L1 на субнанолярном уровне.

[0015] На Фиг. 7 показано, что B12-01 обладает сопоставимой способностью к связыванию с PD-L1 человека и PD-L1 яванского макака.

[0016] На Фиг. 8 показано, что B12-01 эффективно блокировало связывание белка PD1 с PDL1 на поверхности клетки.

[0017] На Фиг. 9 показано, что B12-01 значительно стимулировало активацию Т-клеток человека *in vitro*.

[0018] На Фиг. 10 показана эффективность B12-01 при ингибировании роста опухоли *in vivo*.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

[0019] Следует отметить, что формы единственного числа, относящиеся к одному или более объектам, например, "антителу", представляют одно или более антител.

Фактически, формы единственного числа, а также термины "один или более" и "по меньшей мере, один" можно использовать в настоящей заявке взаимозаменяемо.

[0020] Полинуклеотид или область полинуклеотида (или полипептид или область полипептида), характеризующиеся некоторым процентом (например, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % или 99 %) «идентичности последовательности» по отношению к другой последовательности, означает, что при выравнивании указанный процент оснований (или аминокислот) одинаков при сравнении двух указанных последовательностей. Это выравнивание и процентную гомологию или идентичность последовательности можно определить с использованием программного обеспечения, известного в данной области техники, например, описанного в Ausubel *et al.* eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*. Для выравнивания предпочтительно используют параметры по умолчанию. Одной из программ для выравнивания является BLAST при использовании параметров по умолчанию. В частности, программы представляют собой BLASTN и BLASTP с использованием следующих параметров по умолчанию: Genetic code = standard; filter = none; strand = both; cutoff = 60; expect = 10; Matrix = BLOSUM62; Descriptions = 50 sequences; sort by = HIGH SCORE; Databases = non-redundant, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR. Биологически эквивалентными полинуклеотидами являются полинуклеотиды, характеризующиеся вышеупомянутыми указанными процентами гомологии и кодирующие полипептиды, обладающие одинаковой или аналогичной биологической активностью.

[0021] Термин «эквивалентная нуклеиновая кислота или полинуклеотид» относится к нуклеиновой кислоте, обладающей нуклеотидной последовательностью с определенной степенью гомологии или идентичностью последовательности по отношению к нуклеотидной последовательности указанной нуклеиновой кислоты или ее комплементарной цепи. Подразумевается, что гомолог двуцепочечной нуклеиновой кислоты включает нуклеиновые кислоты, обладающие нуклеотидной последовательностью, характеризующейся определенной степенью гомологии по отношению друг к другу или к комплементарным цепям друг друга. В одном аспекте гомологи нуклеиновых кислот способны гибридизоваться с указанной нуклеиновой кислотой или ее комплементарной цепью. Аналогичным образом, «эквивалентный полипептид» относится к полипептиду, характеризующемуся определенной степенью

гомологии или идентичности последовательности по отношению к аминокислотной последовательности эталонного полипептида. В некоторых аспектах идентичность последовательности составляет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%. В некоторых аспектах эквивалентный полипептид или полинуклеотид содержит одно, два, три, четыре или пять добавлений, делеций, замен и их комбинаций по сравнению с эталонным полипептидом или полинуклеотидом. В некоторых аспектах эквивалентная последовательность сохраняет активность (например, связывание эпитопа) или структуру (например, ионную связь) эталонной последовательности.

[0022] В настоящей заявке термин «антитело» или «антиген-связывающий полипептид» относится к полипептиду или полипептидному комплексу, специфично распознающему антиген и связывающемуся с ним. Антитело может представлять собой целое антитело и любой антигенсвязывающий фрагмент или одиночную цепь антитела. Таким образом, термин «антитело» включает любой белок или пептид, содержащий молекулу, содержащую по меньшей мере фрагмент молекулы иммуноглобулина, обладающий биологической активностью связывания с антигеном. Примеры таких фрагментов включают участок, определяющий комплементарность (CDR) тяжелой или легкой цепи или их лиганд-связывающий фрагмент, вариабельную область тяжелой или легкой цепи, константную область тяжелой или легкой цепи, каркасную (FR) область или любой их фрагмент, или по меньшей мере один фрагмент связывающего белка, но не ограничиваются ими.

[0023] Термины «фрагмент антитела» или «антиген-связывающий фрагмент» в настоящей заявке представляют собой фрагмент антитела, например, $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , Fv , $scFv$ и т.п. Независимо от структуры, фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознает интактное антитело. Термин «фрагмент антитела» включает аптамеры, шпигельмеры и диатела. Термин «фрагмент антитела» также включает любой синтетический белок или белок, полученный с помощью генной инженерии, действующий аналогично антителу, путем связывания со специфичным антигеном с образованием комплекса.

[0024] Термин «одноцепочечный вариабельный фрагмент» или “ $scFv$ ” относится к гибриднему белку вариабельных областей тяжелой (V_H) и легкой цепей (V_L) иммуноглобулинов. В некоторых аспектах эти области соединены коротким пептидным линкером, содержащим от десяти до приблизительно 25 аминокислот. Этот линкер

обычно богат глицином (в целях гибкости), а также серином или треонином (в целях растворимости), и может соединять N-конец V_H с C-концом V_L или наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и внедрение линкера. Молекулы scFv известны в данной области и описаны, например, в патенте США 5,892,019.

[0025] Термин "антитело" охватывает различные классы полипептидов, которые могут различаться с биохимической точки зрения. Специалисты в данной области техники должны принимать во внимание, что тяжелые цепи делятся на гамма-, мю-, альфа-, дельта- или эpsilon-цепи (γ , μ , α , δ , ϵ), внутри которых существуют подклассы (например, γ 1- γ 4). Это является природой данной цепи, которая определяет «класс» антитела, например, IgG, IgM, IgA, IgG или IgE, соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgG₅ и т.д. хорошо изучены и известно, что они характеризуются функциональной специализацией. Квалифицированный специалист легко различает модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов в контексте настоящего изобретения, которые, следовательно, входят в рамки настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов в явном виде входят в рамки настоящего изобретения, и последующее обсуждение будет в целом посвящено классу IgG молекул иммуноглобулинов. По отношению к 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 приблизительно 53000-70000. Указанные четыре цепи обычно соединены дисульфидными связями в "Y"-конфигурацию, где легкие цепи сгруппированы с тяжелыми цепями, начиная с горловины указанной "Y"-конфигурации и далее на протяжении вариабельной области.

[0026] Антитела, антиген-связывающие полипептиды, их варианты или производные согласно настоящему изобретению включают поликлональные, моноклональные, мультиспецифичные, человеческие, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитоп-связывающие фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fv, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, Fv с дисульфидными связями (sdFv), фрагменты, содержащие VK- или VH-домен, фрагменты, продуцированные библиотекой экспрессии Fab, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id антитела к

антителам LIGHT, описанным в настоящей заявке), но не ограничиваются ими. Иммуноглобулины или молекулы антител согласно настоящему изобретению могут относиться к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу молекул иммуноглобулинов.

[0027] Слова «специфично связывается» или «обладает специфичностью к» в общем случае означают, что антитело связывается с эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена и что указанное связывание предусматривает некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Согласно указанному определению, говорят, что антитело «специфично связывается» с эпитопом, если оно связывается с указанным эпитопом через свой антигенсвязывающий домен легче, чем в случае связывания со случайным, неспецифичным эпитопом. Термин «специфичность» используется в настоящей заявке для оценки относительной аффинности, с которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, можно считать, что антитело «А» обладает более высокой специфичностью к данному эпитопу, чем антитело «В», или можно сказать, что антитело «А» связывается с эпитопом «С» с более высокой специфичностью, чем с родственным эпитопом «D».

[0028] В настоящей заявке термины «лечить» и «лечение» относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или предохранительным мерам, причем их целью является предотвращение или замедление (ослабление) нежелательного физиологического изменения или расстройства, например, прогрессирования рака. Благоприятные или желательные клинические результаты включают, без ограничения, смягчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) состояние заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или временное ослабление болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), как обнаружимые, так и необнаружимые. Термин «лечение» также может означать увеличение продолжительности жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни при отсутствии лечения. Лица, нуждающиеся в лечении, включают лиц, которые уже страдают состоянием или расстройством, а также лиц, склонных к состояниям или расстройствам или лиц, у которых это состояние или расстройство следует предотвратить.

[0029] Термин «субъект» или «индивид» или «животное» или «пациент» или «млекопитающее» означает любого субъекта, в частности, субъекта-млекопитающее, для которого диагностика, прогнозирование или терапия являются желательными. Субъекты-млекопитающие включают людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных и животных, содержащихся в зоопарках, используемых в спортивных целях или комнатных животных, например, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупный рогатый скот, коров и т.д.

[0030] В настоящей заявке такие фразы, как «пациенту, нуждающемуся в лечении» или «субъект, нуждающийся в лечении» включают субъектов, например, субъектов-млекопитающих, для которых введение антитела или композиции согласно настоящему изобретению может быть благоприятным, например, для обнаружения, диагностической процедуры и/или лечения.

Антитела против PD-L1

[0031] В настоящем изобретении предложены антитела против PD-L1, в частности, полностью человеческие антитела и фрагменты с высокой аффинностью к белку PD-L1 человека. Исследованные антитела продемонстрировали высокую связывающую и ингибирующую активность и пригодны для терапевтического и диагностического применения.

[0032] Как продемонстрировано в экспериментальных примерах, с помощью фаговых библиотек получили ряд полностью человеческих антител против PD-L1, в том числе B01-B17. Некоторые из этих антител обладали превосходной связывающей активностью. Например, B04, B05, B06, B07, B10, B11, B12, B13, B14 и B16 могли дозозависимо блокировать PD1/PD-L1-опосредованную NFAT-люциферазную активность. Среди них B06, B12 и B16 были наиболее эффективны.

[0033] Антитела согласно настоящему изобретению успешно выдерживали сравнение с существующими на рынке и в клинической разработке продуктами. Используемые эталонные антитела включают атезолизумаб (Tecentriq™), полностью гуманизированное моноклональное антитело изотипа IgG1 с конструированным Fc-фрагментом, и авелумаб (Bavencio™), полностью человеческое моноклональное антитело. Атезолизумаб одобрен для лечения метастатического немелкоклеточного рака

легких (НМРЛ), мелкоклеточного рака легких в активной стадии и трижды негативного рака молочной железы. Авелумаб одобрен для лечения карциномы из клеток Меркеля в США и Европе. Атезолизумаб и авелумаб в настоящее время представляют собой ведущие антитела против PD-L1 на рынке.

[0034] Как показано в Примере 1, лишь немногие из протестированных антител, в том числе B07, B12, B13 и B16, демонстрировали более высокую (или по меньшей мере не худшую) аффинность связывания с PD-L1 по сравнению с атезолизумабом (**Фиг. 1**). Вариант B12, B12-01, дополнительно тестировали по сравнению с атезолизумабом и авелумабом. B12-01 по сравнению с B12 содержало замену на серин на С-конце VH и стандартную последовательность DIQM на N-конце VL.

[0035] Как показано в Примере 5, в анализе аффинности на основе клеток B12-01 превосходило как атезолизумаб, так и авелумаб (**Фиг. 5**). Более высокая эффективность B12-01 по сравнению с атезолизумабом являлась неожиданной, поскольку известно (и доказано), что даже авелумаб, разработанный позже атезолизумаба, был менее эффективен, чем атезолизумаб.

[0036] Кроме того, в Примере 5, в анализе потенциала для разработки лекарственных средств, B12-01 демонстрировал повышенную гидрофильность по сравнению с атезолизумабом, что указывало на повышенную растворимость B12-01 в воде. Таким образом, подобные характеристики B12-01 обеспечивают повышенную гибкость при разработке составов. Кроме того, как показано в Примере 7, B12-01 обладает перекрестной специфичностью по отношению к PD-L1 яванского макака, что является преимуществом во время доклинических исследований на моделях животных.

[0037] Таким образом, в соответствии с одним вариантом реализации настоящего изобретения, предложены антитела, содержащие CDR-участки указанных впервые выявленных антител. Такие последовательности CDR перечислены ниже в Таблице А.

Таблица А. Последовательности CDR антител B01-B17 (нумерация по Kabat)

	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
B01	SHWLA	35	SIHQDASLEFYVDSVEG	43	GDNQFDN	52
B02	TYIIN	36	SVAASGDYAYYANSVKG	44	DRSSGYLSPNDAFDI	53
B03	SYWMS	37	NIKEDGSEKYYVDSVKG	45	VVRFNDAFDI	54
B04	SYWMS	37	NIKQDGSEKYYVDSVKG	46	TMLWDDAFDI	55

B05	SYWMS	37	NIKQDGSEKYYVDSVKG	46	GGYYGDDDAFDI	56
B06	DSWIH	38	WISPYGGSTYYADSVKG	47	RHWPGGFDY	57
B07	SYWMS	37	NIKQDGSEKYYVDSVKG	46	VCGYDDAFDI	58
B08	DHYMD	39	SISSSSYIYYADSVKG	48	GRVGATNRFGMDV	59
B09	SYWMS	37	NIKQDGSEKYYVDSVKG	46	EDFWSGYQDV	60
B10	SYWMS	37	NIKQDGSEKYYVDSVKG	46	ATVKYGGDDAFDI	61
B11	SYAIS	40	GIIPIFGTANYAQKFQG	49	RTDSYGYSDAFDI	62
B12	SYWMS	37	NIKQDGSEKYYVDSVKG	46	VALWDDAFDI	63
B13	SYWMS	37	NIKQDGSEKYYVDSVKG	46	STVKYGADDAFDI	64
B14	SYWMS	37	NIKEDGSEKYYVDSVKG	45	VVRFNDAFDI	54
B15	VYYMA	41	YTSNGDGDITYYADSVKD	50	AARSGYYNDY	65
B16	SYWMS	37	NIKQDGSEKYYVDSVKG	46	VALWDDAFDI	63
B17	SNAMS	42	AVGGGGVNTYYADSVKG	51	GEKGYSNSCIDY	66

	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
B01	RASQSISSYLN	67	AASSLQS	80	QQSYSTPPT	89
B02	RASQTISRVLN	68	ATSSLQS	81	QQSYSTPTT	90
B03	RASQSIDTWLA	69	NASTLKS	82	QQSYSTPLT	91
B04	RASESISSWLA	70	KASSLES	83	QQSYSTPPT	89
B05	RASQSISSWLA	71	KASSLES	83	QQTYSLPLT	92
B06	RASQGISSYLA	72	AASTLQS	84	QQYLSVPYT	93
B07	RASQSIISTWLA	73	KASSLES	83	QQSYSIPLT	94
B08	RASESISRWLA	74	AASNLES	85	QQAESFPS	95
B09	RASQSISSYLN	67	AASSLQS	80	QQSYSTPLT	91
B10	RASQSIDDWLA	75	KASSLES	83	QQSFSTPFT	96
B11	RASQSISSYLN	67	AASSLQS	80	QQSYSTPLT	91
B12	RASRGISSWLA	76	KASSLES	83	QQSSSIPLT	97
B13	RASQSISSWLA	71	KASSLQS	86	QQSYSTPFT	98
B14	RASQGISSWLA	77	AASSLQS	80	QQANSFPFT	99
B15	RASQFISKYVN	78	GASILET	87	QQTHSTPRGV	100
B16	RASQSISSWLA	71	KASSLES	83	QHSNSLPLT	101
B17	QASQDISNYLN	79	DASNLET	88	QQYDNLPPFT	102

[0038] Считается, что можно конструировать небольшие изменения (например, добавление, делецию или замену одиночной аминокислоты) в указанных последовательностях CDR с сохранением или даже улучшением активности антител. Такие модифицированные последовательности CDR называют вариантами CDR.

[0039] Как продемонстрировано в Примере 4, мутантные антитела, содержащие все протестированные варианты CDR, демонстрировали активность, сопоставимую с активностью исходных антител. Таким образом, указанные варианты CDR также входят в рамки настоящего изобретения. В некоторых вариантах реализации указанные

варианты содержат одну или более из таких замен, как D>E, S>A, G>A, N>Q, DS>ES, DS>DA, DG>DA, NS>NA или NS>QS. Некоторые примеры приведены ниже.

Таблица В. Типичные варианты CDR

HCDR1	Последовательность	SEQ ID NO:
Исходная	DSWIH	38
Варианты	<u>E</u> SWIH	132

HCDR2	Последовательность	SEQ ID NO:
Исходная	WISPYGGSTYYADSVKG	47
Варианты	WISPYGGSTYYAD <u>A</u> VKG	133
	WISPYGGSTYYA <u>E</u> SVKG	134

HCDR2	Последовательность	SEQ ID NO:
Исходная	NIKQDGSEKYYVDSVKG	46
Варианты	NIKQDGSEKYYV <u>E</u> SVKG	135
	NIKQD <u>A</u> SEKYYVDSVKG	136
	NIKQD <u>A</u> SEKYYV <u>E</u> SVKG	137
	NIKQ <u>E</u> GSEKYYVDSVKG	143
	NIKQ <u>E</u> GSEKYYVD <u>A</u> VKG	144

LCDR3	Последовательность	SEQ ID NO:
Исходная	QHSNSLPLT	101
Варианты	QHSN <u>A</u> LPLT	138
	QHS <u>Q</u> SLPLT	139

[0040] В одном варианте реализации антитело против PD-L1 или его фрагмент содержат VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:35-42 и их вариантов, имеющих одну или более аминокислотных замен (например, SEQ ID NO:132), VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:43-51 и их вариантов, имеющих одну или более аминокислотных замен (например, SEQ ID NO:133-137 и 143-144), VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:52-66 и их вариантов, имеющих одну или более аминокислотных замен, VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:67-79 и их вариантов, имеющих одну или более аминокислотных замен, VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:80-88 и их вариантов, имеющих одну или более аминокислотных замен, и VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:89-102 и их вариантов, имеющих одну или более аминокислотных замен (например, SEQ ID NO:138-139).

[0041] В некоторых вариантах реализации VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:35-42 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:132), VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:43-51 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:133-137 и 143-144), VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:52-66, VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:67-79, VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:80-88, и VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:89-102 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:138-139).

[0042] В некоторых вариантах реализации последовательности CDR выбраны из B04, B05, B06, B07, B10, B11, B12, B13, B14 или B16. В некоторых вариантах реализации VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:37-38 и 40 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:132), VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:45-47 и 49 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:133-137 и 143-144), VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:54-58 и 61-64, VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:67, 70-73 и 75-77, VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:80, 83-84 и 86, и VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:89, 91-94, 96-99 и 101 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:138-139).

[0043] В некоторых вариантах реализации последовательности CDR выбраны из B06, B12 или B16. В некоторых вариантах реализации VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:37-38 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:132), VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:46-47 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:133-137 и 143-144), VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:57 и 63, VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:71-72 и 76, VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:83-84, и VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:93, 97 и 101 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:138-139).

[0044] Последовательности CDR антитела или фрагмента согласно настоящему изобретению можно выбрать из последовательностей конкретного антитела B01-B17,

приведенных в Таблице А. Например, VH CDR1 может представлять собой SEQ ID NO:35, VH CDR2 может представлять собой SEQ ID NO:45, VH CDR3 может представлять собой SEQ ID NO:55, VL CDR1 может представлять собой SEQ ID NO:70, VL CDR2 может представлять собой SEQ ID NO:83, и VL CDR3 может представлять собой SEQ ID NO:92 (например, B01). Типичное антитело или фрагмент содержит VH SEQ ID NO:1 и VL SEQ ID NO:2. Другие последовательности CDR и VH/VL представлены в Таблице А и Таблице 1.

[0045] В одном варианте реализации указанный VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:132), указанный VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:133-134), указанный VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57, указанный VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72, указанный VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84, и указанный VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:93 (например, B06). Типичное антитело или фрагмент содержит VH SEQ ID NO:11 (или вариант, например, SEQ ID NO:121-123) и VL SEQ ID NO:12.

[0046] В одном варианте реализации указанный VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, указанный VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46 (или вариант, например, SEQ ID NO:135-137 или 143-143), указанный VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63, указанный VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, указанный VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, и указанный VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97 (например, B12). Типичное антитело или фрагмент содержит VH SEQ ID NO:23 (или вариант, например, SEQ ID NO:124, 126, 127, 128, 130, 140 или 145) и VL SEQ ID NO:24 (или вариант, например, SEQ ID NO:125).

[0047] В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело или его фрагмент обладают специфичностью по отношению к лиганду-1 белка запрограммированной гибели клеток (PD-L1) человека и содержат переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, и переменную область легкой цепи

(VL), содержащую VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, причем VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63, VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, и VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97.

[0048] В некоторых вариантах реализации VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:124 или первую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% (или по меньшей мере 90%, 85%) идентичности последовательности с SEQ ID NO:124, и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125 или вторую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% (или по меньшей мере 90%, 85%) идентичности последовательности с SEQ ID NO:125.

[0049] В одном варианте реализации указанный VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, указанный VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46 (или вариант, например, SEQ ID NO:135-137 или 143-143), указанный VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63, указанный VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71, указанный VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, и указанный VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:101 (или вариант, например, SEQ ID NO:138-139 (например, B16). Типичное антитело или фрагмент содержит VH SEQ ID NO:31 (или вариант, например, SEQ ID NO:124, 126, 127, 128, 130, 140 или 145) и VL SEQ ID NO:32 (или вариант, например, SEQ ID NO:129 и 131).

[0050] В Таблице А представлены последовательности CDR в соответствии с системой Kabat Система Chothia обычно использует другие последовательности VH CDR1 и CDR2. Они показаны ниже в Таблице С.

Таблица С. Последовательности и варианты CDR в соответствии с системой Chothia

	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
--	-------	------------	-------	------------	-------	------------

B01	GFTLSSH	103	HQDASL	112	GDNQFDN	52
B02	GFTFSTY	104	AASGDY	113	DRSSGYLSPNDAFDI	53
B03	GFSFSSY	105	KEDGSE	114	VVRFNDAFDI	54
B04	GFTFSSY	106	KQDGSE	115	TMLWDDAFDI	55
B05	GFTFSSY	106	KQDGSE	115	GGYYGDDDAFDI	56
B06	GFTFSDS	107	SPYGGG	116	RHWPGGFDY	57
B07	GFTFSSY	106	KQDGSE	115	VCGYDDAFDI	58
B08	GFTFSDH	108	SSSSSY	117	GRVGATNRFMDV	59
B09	GFTFSSY	106	KQDGSE	115	EDFWSGYQDV	60
B10	GFTFSSY	106	KQDGSE	115	ATVKYGGDDAFDI	61
B11	GGTFSSY	109	IPIFGT	118	RTDSYGYSDAFDI	62
B12	GFTFSSY	106	KQDGSE	115	VALWDDAFDI	63
B13	GFTFSSY	106	KQDGSE	115	STVKYGADDAFDI	64
B14	GFSFSSY	105	KEDGSE	114	VVRFNDAFDI	54
B15	GFTFSVY	110	SNGDGDI	119	AARSGYNDY	65
B16	GFTFSSY	106	KQDGSE	115	VALWDDAFDI	63
B17	GFTFSSN	111	GGGGVN	120	GEKGYSNSCIDY	66

	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
B01	RASQSISSYLN	67	AASSLQS	80	QQSYSTPPT	89
B02	RASQTISRYLN	68	ATSSLQS	81	QQSYSTPTT	90
B03	RASQSIDTWLA	69	NASTLKES	82	QQSYSTPLT	91
B04	RASESISSWLA	70	KASSLES	83	QQSYSTPPT	89
B05	RASQSISSWLA	71	KASSLES	83	QQTYSLPLT	92
B06	RASQGISSYLA	72	AASTLQS	84	QQYLSVPYT	93
B07	RASQSIISTWLA	73	KASSLES	83	QQSYSIPLT	94
B08	RASESISRWLA	74	AASNLES	85	QQAESFPS	95
B09	RASQSISSYLN	67	AASSLQS	80	QQSYSTPLT	91
B10	RASQSIDDWLA	75	KASSLES	83	QQSFSTPFT	96
B11	RASQSISSYLN	67	AASSLQS	80	QQSYSTPLT	91
B12	RASRGISSWLA	76	KASSLES	83	QQSSSIPLT	97
B13	RASQSISSWLA	71	KASSLQS	86	QQSYSTPFT	98
B14	RASQGISSWLA	77	AASSLQS	80	QQANSFPFT	99
B15	RASQFISKYVN	78	GASILET	87	QQTHSTPRGV	100
B16	RASQSISSWLA	71	KASSLES	83	QHSNSLPLT	101
B17	QASQDISNYLN	79	DASNLET	88	QQYDNLPPFT	102

HCDR1	Последовательность	SEQ ID NO:
Исходная	GFTFSDS	107
Варианты	GFTFS <u>E</u> S	141

HCDR2	Последовательность	SEQ ID NO:
Исходная	KQDGSE	115
Варианты	KQD <u>A</u> SE	142

LCDR3	Последовательность	SEQ ID NO:
Исходная	QHSNSLPLT	101
Варианты	QHSN <u>A</u> LPLT	138
	QHS <u>Q</u> SLPLT	139

[0051] В одном варианте реализации антитело против PD-L1 или его фрагмент содержат VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:103-111 и их вариантов, имеющих одну или более аминокислотных замен (например, SEQ ID NO:141), VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:112-120 и их вариантов, имеющих одну или более аминокислотных замен (например, SEQ ID NO:142), VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:52-66 и их вариантов, имеющих одну или более аминокислотных замен, VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:67-79 и их вариантов, имеющих одну или более аминокислотных замен, VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:80-88 и их вариантов, имеющих одну или более аминокислотных замен, и VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:89-102 и их вариантов, имеющих одну или более аминокислотных замен (например, SEQ ID NO:138-139).

[0052] В некоторых вариантах реализации VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 103-111 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:141), VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 112-120 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:142), VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:52-66, VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:67-79, VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:80-88, и VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:89-102 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:138-139).

[0053] В некоторых вариантах реализации последовательности CDR выбраны из B04, B05, B06, B07, B10, B11, B12, B13, B14 или B16. В некоторых вариантах реализации VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:105-107 и 109 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:141), VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:114-116 и 118 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:142), VH CDR3 содержит аминокислотную

последовательность, выбранную из SEQ ID NO:54-58 и 61-64, VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:67, 70-73 и 75-77, VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:80, 83-84 и 86, и VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:89, 91-94, 96-99 и 101 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:138-139).

[0054] В некоторых вариантах реализации последовательности CDR выбраны из B06, B12 или B16. В некоторых вариантах реализации VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:106-107 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:141), VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:115-116 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:142), VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:57 и 63, VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:71-72 и 76, VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:83-84, и VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:93, 97 и 101 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:138-139).

[0055] Последовательности CDR антитела или фрагмента согласно настоящему изобретению можно выбрать из последовательностей конкретного антитела B01-B17, приведенного в Таблице А. Например, VH CDR1 может представлять собой SEQ ID NO:35, VH CDR2 может представлять собой SEQ ID NO:45, VH CDR3 может представлять собой SEQ ID NO:55, VL CDR1 может представлять собой SEQ ID NO:70, VL CDR2 может представлять собой SEQ ID NO:83, и VL CDR3 может представлять собой SEQ ID NO:92 (например, B01). Типичное антитело или фрагмент содержит VH SEQ ID NO:1 и VL SEQ ID NO:2. Другие последовательности CDR и VH/VL представлены в Таблице А и Таблице 1.

[0056] В одном варианте реализации указанный VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:107 (или ее вариант, например, SEQ ID NO:141), указанный VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116), указанный VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57, указанный VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72, указанный VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84, и указанный VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:93

(например, B06). Типичное антитело или фрагмент содержит VH SEQ ID NO:11 (или вариант, например, SEQ ID NO:121- 123) и VL SEQ ID NO:12.

[0057] В одном варианте реализации указанный VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:106, указанный VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115 (или вариант, например, SEQ ID NO:142), указанный VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63, указанный VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, указанный VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, и указанный VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97 (например, B12). Типичное антитело или фрагмент содержит VH SEQ ID NO:23 (или вариант, например, SEQ ID NO:124, 126, 127, 128, 130, 140 или 145) и VL SEQ ID NO:24 (или вариант, например, SEQ ID NO:125).

[0058] В одном варианте реализации указанный VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:106, указанный VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115 (или вариант, например, SEQ ID NO:142), указанный VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63, указанный VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71, указанный VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, и указанный VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:101 (или вариант, например, SEQ ID NO:138-139 (например, B16). Типичное антитело или фрагмент содержит VH SEQ ID NO:31 (или вариант, например, SEQ ID NO:124, 127, 128, 130, 140 или 145) и VL SEQ ID NO:32 (или вариант, например, SEQ ID NO:129 и 131).

[0059] Кроме того, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены антитела и антигенсвязывающие фрагменты против PD-L1, конкурирующие с любым из антител, описанных в настоящей заявке, за связывание с PD-L1 человека. Кроме того, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены антитела и антигенсвязывающие фрагменты против PD-L1, связывающиеся с тем же эпитопом, что и любое из антител, описанных в настоящей заявке. Кроме того, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены антитела и антигенсвязывающие фрагменты против PD-L1, содержащие VH CDR1, CDR2 и CDR3, и VL CDR1, CDR2 и CDR3 антител, описанных в настоящей заявке.

[0060] Кроме того, специалист в данной области техники должен понимать, что антитела, описанные в настоящей заявке, можно модифицировать таким образом, что их аминокислотная последовательность будет отличаться от встречающегося в природе связывающего полипептида, из которого они происходят. Например, полипептид или аминокислотная последовательность, происходящие от указанного белка, могут быть сходны, например, могут обладать определенным процентом идентичности по отношению к исходной последовательности, например, могут быть на 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичны исходной последовательности. В некоторых вариантах реализации модифицированное антитело или его фрагмент сохраняет указанные последовательности CDR.

[0061] В некоторых вариантах реализации антитело содержит аминокислотную последовательность или одну или более групп, в норме не ассоциированных с антителом. Типичные модификации подробно описаны ниже. Например, антитело согласно настоящему изобретению может содержать последовательность гибкого линкера или может быть модифицировано путем добавления функциональной группы (например, ПЭГ, лекарственного средства, токсина или метки).

Полинуклеотиды, кодирующие антитела, и способы получения антител

[0062] В настоящем изобретении также предложены выделенные полинуклеотиды или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела, их варианты и производные согласно настоящему изобретению. Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут кодировать целые вариабельные области тяжелой и легкой цепи антигенсвязывающих полипептидов, их варианты и производные на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов. Кроме того, полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут кодировать фрагменты вариабельных областей тяжелой и легкой цепи антиген-связывающих полипептидов, их варианты и производные на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов.

[0063] Способы получения антител хорошо известны в данной области техники и описаны в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации как вариабельные, так и константные области антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению являются полностью человеческими. Полностью человеческие антитела

можно получить, используя методики, описанные в данной области техники и в настоящей заявке. Например, полностью человеческие антитела против специфического антигена можно получить путем введения антигена в организм трансгенного животного, модифицированного с целью продукции таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, причем эндогенные локусы указанного животного отключены. Типичные методики, которые можно применять для получения таких антител описаны в патентах США 6,150,584; 6,458,592; 6,420,140, полностью включенных в настоящую заявку посредством ссылок.

Лечение рака

[0064] Антитела, варианты или производные согласно настоящему изобретению, описанные в настоящей заявке, можно применять в различных способах лечения и диагностики.

[0065] Настоящее изобретение дополнительно относится к терапевтическим способам на основе антител, включающим введение антител согласно настоящему изобретению пациенту, например, животному, млекопитающему и человеку для лечения одного или более из расстройств или состояний, описанных в настоящей заявке. Терапевтические соединения согласно настоящему изобретению включают антитела согласно настоящему изобретению (включая их варианты и производные, описанные в настоящей заявке) и нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды, кодирующие антитела согласно настоящему изобретению (включая их варианты и производные, описанные в настоящей заявке), но не ограничиваются ими.

[0066] Кроме того, антитела согласно настоящему изобретению можно использовать для лечения или подавления рака. PD-L1 может избыточно экспрессироваться в опухолевых клетках. Происходящий из опухоли PD-L1 может связываться с PD-1 на иммунных клетках, ограничивая таким образом противоопухолевый Т-клеточный иммунитет. Результаты применения низкомолекулярных ингибиторов или моноклональных антител, нацеленных на PD-L1, в моделях опухолей на мышах показывают, что нацеленная на PD-L1 терапия является важной альтернативой и представляет собой реалистичный подход к эффективному контролю роста опухоли. Как продемонстрировано в экспериментальных примерах, антитела против PD-L1

активировали механизмы адаптивного иммунного ответа, что может приводить к улучшенному выживанию у страдающих раком пациентов.

[0067] Соответственно, в некоторых вариантах реализации предложены способы лечения рака у пациента, нуждающегося в этом. В одном варианте реализации способ предусматривает введение пациенту эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере одна из раковых клеток (например, стромальных клеток) у пациента экспрессирует, избыточно экспрессирует или индуцирована, чтобы экспрессировать PD-L1. Индукция экспрессии PD-L1, например, может быть проведена путем введения противоопухолевой вакцины или проведения радиационной терапии.

[0068] Опухоли, которые экспрессируют белок PD-L1, включают рак мочевого пузыря, немелкоклеточный рак легкого, рак почек, рак молочной железы, рак уретры, рак ободочной и прямой кишки, рак головы и шеи, плоскоклеточный рак, карциному из клеток Меркеля, рак желудочно-кишечного тракта, рак желудка, рак пищевода, рак яичников, рак почек и мелкоклеточный рак легкого. Соответственно, предложенные согласно настоящему изобретению антитела могут применяться для лечения любого одного или более из таких видов рака.

[0069] Кроме того, в настоящем изобретении предложены клеточные терапевтические средства, например, терапевтические средства на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR). Может применяться подходящая клетка, которую приводят в контакт с антителом против PD-L1 согласно настоящему изобретению (или, как вариант, сконструированная таким образом, чтобы экспрессировать антитело против PD-L1 согласно настоящему изобретению). После такого контакта или конструирования клетка может быть, соответственно, введена имеющему раку пациенту, нуждающемуся в лечении. У имеющего раку пациента может быть рак любого типа, описанного в настоящей заявке. Клетка (например, Т-клетка) может представлять собой, например, инфильтрирующий опухоль Т-лимфоцит, CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку или комбинацию перечисленных клеток, без ограничения.

[0070] Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка была выделена собственно из организма имеющего раку пациента. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка была получена от донора или из банка клеток. При

выделении клетки из организма имеющего рак пациента можно минимизировать нежелательные иммунные реакции.

[0071] Дополнительные заболевания или состояния, ассоциированные с повышенной выживаемостью клеток, лечение, предотвращение, диагностика и/или прогнозирование которых может быть проведено с применением антител или их вариантов или производных согласно настоящему изобретению, включают, не ограничиваясь перечисленными, прогрессирование и/или метастазирование злокачественных новообразований и связанных с ними расстройств, например, лейкоз (в том числе острые лейкозы (*например*, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз (в том числе миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный лейкоз и эритролейкоз)) и хронические лейкозы (например, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз)), истинная полицитемия, лимфомы (*например*, болезнь Ходжкина и неходжкинская лимфома), множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей и солидные опухоли, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, 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, базально-клеточная карцинома, аденокарцинома, карцинома потовых желез, карцинома сальных желез, папиллярная карцинома, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарциномы, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечноклеточная карцинома, гепатома, карцинома желчного протока, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, карцинома легкого, мелкоклеточная карцинома легкого, карцинома мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимомы, пинеаломы, гемангиобластома, акустическая невринома, олигодендроглиомы, менингиомы, меланома, нейробластома и ретинобластома.

Лечение инфекций

[0072] Как продемонстрировано в экспериментальных примерах, антитела согласно настоящему изобретению могут активировать иммунный ответ, который, соответственно, может быть полезен для лечения инфекций.

[0073] Инфекция представляет собой инвазию в ткани организма болезнетворных агентов, их размножение и реакцию тканей хозяина на указанные организмы и продуцируемые ими токсины. Инфекция может быть вызвана инфекционными агентами, такими как вирусы, вироиды, прионы, бактерии, нематоды, такие как паразитические круглые черви и острицы, членистоногие, такие как клещи и иксодовые клещи, блохи и вши, грибы, такие как возбудители трихофитии, и другие макропаразиты, такие как ленточные черви и другие гельминты. Согласно одному аспекту, указанный инфекционный агент представляет собой бактерию, например, грамотрицательную бактерию. Согласно одному аспекту, указанный инфекционный агент представляет собой вирус, например, ДНК-вирусы, РНК-вирусы и вирусы, использующие обратную транскрипцию. Неограничивающие примеры вирусов включают аденовирус, вирус Коксаки, вирус Эпштейна-Барр, вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус простого герпеса, тип 1, вирус простого герпеса 2 типа, цитомегаловирус, герпесвирус человека 8 типа, ВИЧ, вирус гриппа, вирус кори, вирус эпидемического паротита, папилломавирус человека, вирус парагриппа, полиовирус, вирус бешенства, респираторно-синцитиальный вирус, вирус краснухи, вирус ветряной оспы.

[0074] Антитела согласно настоящему изобретению могут также применяться для лечения инфекционного заболевания, вызываемого микроорганизмом, или уничтожения микроорганизма путем нацеливания на указанный микроорганизм и нацеливания иммунной клетки для осуществления элиминации указанного микроорганизма. Согласно одному аспекту указанный микроорганизм представляет собой вирус, в том числе РНК-вирусы и ДНК-вирусы, грамположительную бактерию, грамотрицательную бактерию, простейшее или гриб.

[0075] Конкретная дозировка и схема лечения конкретного пациента зависит от различных факторов, в том числе конкретных используемых антител, их вариантов и производных, возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола и питания

пациента, и также времени введения, скорости выведения, комбинации лекарственных средств и тяжести конкретного заболевания, подвергаемого лечению. Экспертная оценка таких факторов медицинскими работниками входит в обычные навыки специалиста в данной области техники. Количество также зависит от индивидуальных особенностей пациента, подвергаемого лечению, пути введения, типа состава, характеристик используемого соединения, тяжести заболевания и желательного эффекта. Используемое количество можно определить с помощью фармакологических и фармакокинетических принципов, хорошо известных в данной области техники.

[0076] Способы введения антител, их вариантов включают интрадермальное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное, подкожное, интраназальное, эпидуральное и пероральное введение, но не ограничиваются ими. Антиген-связывающие полипептиды или их композиции можно вводить любым удобным путем, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем всасывания через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую полости рта, слизистую заднего прохода или кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Таким образом, фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие полипептиды согласно настоящему изобретению, можно вводить перорально, ректально, парентерально, интрацистернально, интравагинально, внутрибрюшинно, наружно (в виде порошков, мазей, капель или трансдермального пластыря), буккально или в виде перорального или назального аэрозоля.

[0077] Термин «парентеральный» в настоящей заявке относится к режимам введения, включающим внутривенную, внутримышечную, внутрибрюшинную, внутригрудинную, подкожную и внутрисуставную инъекцию и инфузию.

[0078] Введение может быть системным или местным. Кроме того, может быть желательным введение антител согласно настоящему изобретению в центральную нервную систему любым подходящим путем, включая внутрижелудочковую или интратекальную инъекцию; внутрижелудочковую инъекцию можно облегчить с помощью внутрижелудочкового катетера, например, присоединенного к резервуару, например, резервуару Оммаи. Кроме того, можно использовать пульмональное введение, например, с помощью ингалятора или небулайзера и состава с агентом, способствующим образованию аэрозоля.

[0079] Может быть желательным введение полипептидов-антител или композиций с антителами согласно настоящему изобретению локально в область, где необходимо лечение; это может быть достигнуто, например, но без ограничений, путем местной инфузии во время хирургического вмешательства, местного нанесения, *например*, в сочетании с раневой повязкой после хирургического вмешательства, путем инъекции, через катетер, в виде суппозитория или имплантата, причем указанный имплантат может быть представлен пористым, непористым или гелеобразным материалом, в том числе мембранами, такими как силиконовые мембраны, или волокнами. При введении белка, в том числе антитела согласно настоящему изобретению, следует следить за тем, чтобы использовать материалы, не абсорбирующие белок.

[0080] Способы лечения инфекционного или злокачественного заболевания, состояния или расстройства, включающие введение антитела, его варианта или производного согласно настоящему изобретению обычно тестируют *in vitro*, и затем *in vivo* в соответствующей модели животного на предмет желательной терапевтической или профилактической активности перед применением на людях. Подходящие животные модели, в том числе трансгенные животные, хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, анализы *in vitro* для демонстрации терапевтического эффекта антигенсвязывающего полипептида, описанного в настоящей заявке, включают действие антигенсвязывающего полипептида на линию клеток или образец ткани пациента. Действие антигенсвязывающего полипептида на линию клеток и/или образец ткани можно определить с использованием методик, известных специалистам в данной области техники, например, анализов, описанных в других частях настоящей заявки. В соответствии с настоящим изобретением анализы *in vitro*, которые можно применять для определения того, показано ли введение специфичного антиген-связывающего полипептида, включают анализы в культуре клеток *in vitro*, в которых образец ткани пациента выращивают в культуре, подвергают действию или иным образом обрабатывают соединением и наблюдают действие такого соединения на образец ткани.

Способы диагностики

[0081] Избыточная экспрессия PD-L1 наблюдается в образцах определенных опухолей, и пациенты с избыточно экспрессирующими PD-L1 клетками, предположительно будут отвечать на лечение антителами против PD-L1 согласно настоящему изобретению.

Соответственно, антитела согласно настоящему изобретению также можно использовать в диагностических или прогностических целях.

[0082] Образец, который предпочтительно содержит клетку, можно получить из организма пациента, который может быть имеющим рак пациентом или пациентом, для которого желательно выполнить диагностику. Клетка может представлять собой клетку опухолевой ткани или блока опухоли, образца крови, образца мочи или любого образца из организма пациента. После необязательной предварительной обработки образца указанный образец может быть инкубирован с антителом согласно настоящему изобретению в условиях, позволяющих указанному антителу взаимодействовать с белком PD-L1, потенциально присутствующим в образце. Для обнаружения присутствия белка PD-L1 в образце можно применять такие методы, как ИФА, используя преимущества антитела против PD-L1.

[0083] Присутствие белка PD-L1 в образце (необязательно с определением количества или концентрации) может быть использовано для диагностики рака, как показатель того, что пациент подходит для лечения указанным антителом, или как показатель того, что пациент прореагировал (или не прореагировал) на лечение рака. Для прогностического способа обнаружение выполняют один, два или большее количество раз на определенных стадиях после инициации лечения рака для указания на ход лечения.

Композиции

[0084] В настоящем изобретении также предложены фармацевтические композиции. Такие композиции содержат эффективное количество антитела и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах реализации композиции дополнительно содержат второй противораковый агент (например, ингибитор ключевого компонента иммунного ответа).

[0085] В конкретном варианте реализации термин «фармацевтически приемлемый» обозначает одобренный нормативно-правовым агентством федерального правительства или правительства штата или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, конкретнее, у человека. Кроме того, «фармацевтически приемлемый носитель» в общем случае представляет

собой нетоксичный твердый, полужидкий или жидкий наполнитель, разбавитель, материал для инкапсуляции или вспомогательный состав любого типа.

[0086] Термин «носитель» относится к разбавителю, адьюванту, вспомогательному веществу или среде-носителю, с которым вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, например, воду и масла, включая масла нефти, растительного, животного или синтетического происхождения, например, 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 использовать в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. 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, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. При необходимости композиция также может содержать небольшие количества увлажнителей или эмульгаторов или pH-буферных агентов, например, ацетатов, цитратов или фосфатов. Кроме того, предусмотрено применение антибактериальных агентов, например, бензилового спирта или метилпарабенов; антиоксидантов, например, аскорбиновой кислоты или бисульфита натрия; хелатообразующих агентов, например, этилендиаминтетрауксусной кислоты; и агентов для регулировки тоничности, например, хлорида натрия или декстрозы. Эти композиции могут иметь вид растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т.п. Композицию можно составить в виде суппозитория с использованием традиционных связующих веществ и носителей, например, триглицеридов. Составы для перорального применения могут содержать стандартные носители, например, маннит, лактозу, крахмал, стеарат магния, сахарин-натрий, целлюлозу, карбонат магния и т.д. фармацевтической степени чистоты. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны E. W. Martin в Remington's Pharmaceutical Sciences, включенном в настоящую заявку посредством ссылки. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего полипептида, предпочтительно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя для получения формы для надлежащего введения пациенту. Состав должен соответствовать способу введения. Исходный препарат можно

поместить в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы с множественными дозами из стекла или пластика.

[0087] В одном варианте реализации композицию составляют в соответствии с обычными процедурами в виде фармацевтической композиции, приспособленной для внутривенного введения людям. Обычно композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости композиция также может содержать солюбилизирующий агент и местный анестетик, например, лигнокаин, для ослабления боли в области инъекции. В общем случае ингредиенты вводят отдельно или в смеси друг с другом в составе лекарственной формы, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметичном контейнере, например, ампуле или саше с указанием количества активного агента. Если композиция предназначена для введения посредством инфузии, ее можно разлить в бутылку для инфузии, содержащую стерильную воду или стерильный физиологический раствор фармацевтической степени чистоты. Если композицию вводят посредством инъекции, можно обеспечить ампулу со стерильной водой для инъекций или стерильным физиологическим раствором для смешивания ингредиентов перед введением.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Пэннинг и скрининг полностью человеческой наивной фаговой библиотеки

[0088] В данном примере показан скрининг полностью человеческих антител против PD-L1 из фаговой библиотеки.

[0089] *Антиген:* белок внеклеточного домена (ECD) PDL1 человека, меченый авидин-His-биотином (B3568B, Biointron).

[0090] *Получение полностью человеческой наивной фаговой библиотеки:* Фаговую библиотеку конструировали с использованием фагмидных векторов, состоявших из фрагментов генов антител, амплифицированных из МПК здоровых субъектов-людей. Ее конструировали как фаговую библиотеку Fab-фрагментов. Размер библиотеки составлял 2×10^{11} .

[0091] Пэннинг раствора фаговой библиотеки против белка ECD PDL1. Фаговые библиотеки вначале подвергали отрицательному скринингу путем инкубирования со стрептавидиновыми гранулами Dynabeads, покрытыми БСА. Полученные фаги инкубировали с белком ECD PDL1-авидин-his-биотин и промывали в системе магнитных гранул Kingfisher. Связавшиеся фаги элюировали трипсином. Затем тестировали титр связывания антигена элюированными фагами (выход 1) и совместно культивировали фаги с *E. coli*. Выполняли три цикла пэннинга и скрининга. Титры выхода 2 и выхода 3 были значимо повышены.

[0092] Одиночные клоны отбирали из выхода 2 и 3, а затем культивировали в 96-луночной планшете с глубокими лунками. Супернатант культуры подвергали концентрированию IgG и оценке титра связывания антигена. Отобрали 277 положительных клонов, которые подвергли секвенированию. После анализа последовательности выявили 128 уникальных последовательностей. Все эти клоны подвергли анализу связывания путем ИФА. 17 лучших выделенных последовательностей см. ниже в таблице. 17 лучших связывающихся последовательностей см. ниже в Таблице 1.

Таблица 1. Последовательности кандидатов-антител

Клон	АК последовательность (SEQ ID NO:) (CDR в соответствии с системой Kabat выделены подчеркнутым шрифтом)	№ антитела
67A3-5	VH (SEQ ID NO:1) EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F T L S <u>SHWLA</u> WVRQAPGKGLEWVA <u>SIHQDASLE</u> <u>FYVDSVEGR</u> FRTISRDN SKRSLFLQMNLRVEDTAVYYCARGD <u>NQFDN</u> WGQGT LVT VSA VL (SEQ ID NO:2) DIVMTQSPSSLSASVGD RVTITC <u>RASQSISSYLN</u> WYQQKPGKAPKLLIYA <u>AASSLQSGV</u> PSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC <u>QQSYSTPPT</u> FGPGTKVDIK	B01
67A2-20	VH (SEQ ID NO:3) QVQLLES GGG L V K P G G S L R L S C A A S G F T F S <u>TYIIN</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>SVAASGDYA</u> <u>YYANSVKGR</u> FRTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR <u>DRSSGYLSPNDAFDI</u> WG QGTMTVTVSA VL (SEQ ID NO:4) NIQLTQSPSSLSASLGDRVTITC <u>RASQTISR YLN</u> WYQQKPGKAPELLIYA <u>TSSLQSGV</u> PSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC <u>QQSYSTPTT</u> FGGGTKVEIK	B02
67A3-14	VH (SEQ ID NO:5) EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F S F S <u>SYWMS</u> WVRQAPGKGLEWVA <u>NIKEDGSEK</u> <u>YYVDSVKGR</u> FRTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR <u>VVRFNDAFDI</u> WGQGTMTV VSA VL (SEQ ID NO:6) DIQLTQSPSTLSASVGD RVTITC <u>RASQSIDTWLA</u> WYQQKPGKAPKLLIH <u>NASTLKS</u> GV SSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC <u>QQSYSTPLT</u> FGGGTKVEIK	B03
67A3-15	VH (SEQ ID NO:7)	B04

	QVQLLDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS<u>SYWMS</u>WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEK <u>YYVDSVKGR</u>FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>TMLWDDAFDI</u>WGQGTMTV VSA VL (SEQ ID NO:8) DIQLTQSPSTLSASVGDRTITC<u>RASESISSWLA</u>WYQQKPGKVPKLLIY<u>KASSLES</u>GV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC<u>QQSYSTPPT</u>FGQGTKVEIK	
67A3-21	VH (SEQ ID NO:9) EVQLVETGRGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS<u>SYWMS</u>WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEK <u>YYVDSVKGR</u>FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>GGYYGDDDAFDI</u>WGQGTMT VTVSA VL (SEQ ID NO:10) NIQMTQSPSTLSASVGDRTITC<u>RASQSISSWLA</u>WYQQKPGKAPKLLIY<u>KASSLES</u>GV PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC<u>QQTYSLPLT</u>FGQGTRVGIK	B05
67A3-40	VH (SEQ ID NO:11) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS<u>DSWIH</u>WVRQAPGKGLEWVAWISPYGGST <u>YYADSVKGR</u>FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>RHWPGGFDY</u>WGQGTTLTV SA VL (SEQ ID NO:12) DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC<u>RASQGISSYLA</u>WYQQKPGKAPKLLIY<u>AASTLQS</u>GV PDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDEVAVYYC<u>QQYLSVPYT</u>FGQGTKVEIK	B06
67C1-5	VH (SEQ ID NO:13) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS<u>SYWMS</u>WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEK <u>YYVDSVKGR</u>FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>VCGYDDAFDI</u>WGQGTMTV VSA VL (SEQ ID NO:14) NIQMTHTSPSTLSASVGDRTITC<u>RASQSISTWLA</u>WYQQKPGKAPKLLIY<u>KASSLES</u>GV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC<u>QQSYSIPLT</u>FGGGTKVEIK	B07
67C2-1	VH (SEQ ID NO:15) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVSGGFTFS<u>DHYMD</u>WVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYI <u>YYADSVKGR</u>FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>GRVGATNRF</u>GMDVWGQGT MTVSA VL (SEQ ID NO:16) DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC<u>RASESISRWLA</u>WYQQKPGKAPKLLIY<u>AASNLES</u>GV PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC<u>QQAESFPS</u>FGQGTRLEIK	B08
67C2-9	VH (SEQ ID NO:17) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS<u>SYWMS</u>WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEK <u>YYVDSVKGR</u>FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>EDFWSGYQDV</u>WGQGTMTV VSA VL (SEQ ID NO:18) DIQLTQSPSSLSASVGDRTITC<u>RASQSISSYLN</u>WYQQKPGKAPKLLIY<u>AASSLQS</u>GV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC<u>QQSYSTPLT</u>FGGGTKVEIK	B09
67C3-14	VH (SEQ ID NO:19) QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS<u>SYWMS</u>WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEK <u>YYVDSVKGR</u>FTISRDNAKNSLFLQMNSLGAEDTAMYYCAR<u>ATVKYGGDDAFDI</u>WGQGT MTVSA VL (SEQ ID NO:20) NIQLTQSPSTLSASVGDRTITC<u>RASQSIDWLA</u>WYQQKPGKAPNLLIY<u>KASSLES</u>GV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC<u>QQSFSPTFT</u>FGPGTKVDIK	B10
67C3-17	VH (SEQ ID NO:21) EVQLLES GA EVKKPGSSVKVSKASGGFTFS<u>SYAIS</u>WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTA <u>NYAQKFQGR</u>VTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR<u>RTDSYGYSDAFDI</u>WGQGT MTVSA VL (SEQ ID NO:22) DIQLTQSPSSLSASVGDRTITC<u>RASQSISSYLN</u>WYQQKPGKAPKLLIY<u>AASSLQS</u>GV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC<u>QQSYSTPLT</u>FGGGTKVEIK	B11
67C1-9	VH (SEQ ID NO:23)	B12

	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SYWMS</u> WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEK <u>YYVDSVKGR</u> RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>VALWDDAFDI</u> WGQGTMTV VSA VL (SEQ ID NO:24) NIQLTQSPSTLSASVGDRTITC <u>RASRGISSWLA</u> WYQQKPGKAPNLLIS <u>KASSLES</u> GV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQSSSIPLT</u> FGGGTKVEIK	
67C1-10	VH (SEQ ID NO:25) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SYWMS</u> WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEK <u>YYVDSVKGR</u> RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCAR <u>STVKYGADDAFDI</u> WGQGA MVTVSA VL (SEQ ID NO:26) NIQMTQSPSTLSASVGDRTITC <u>RASQSISWLA</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>KASSLQS</u> GV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQSYSTPFT</u> FGPGTKVDIK	B13
67C2-19	VH (SEQ ID NO:27) EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFS <u>SYWMS</u> WVRQAPGKGLEWVANIKEDGSEK <u>YYVDSVKGR</u> RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>VVRFNDAFDI</u> WGQGTMTV VSA VL (SEQ ID NO:28) NIQLTQSPSSVSASVGDRTITC <u>RASQGISWLA</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>AASSLQS</u> GV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQANSFPFT</u> FGPGTKVDIK	B14
67C1-14	VH (SEQ ID NO:29) EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCASGFTFS <u>VYYMA</u> WIRQAPGEGLEWISYTSNGDGI <u>TTYADSVKD</u> RFTISRDNAKNSLLQMNSLRDEDVAVYYCVR <u>AARSGYYNDY</u> WGQGTLV TVSA VL (SEQ ID NO:30) DIQLTQSPSSLSASVGDRTITC <u>RASQFISKYVN</u> WYQQKPGKAPKVLIIY <u>GASILET</u> GV PSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDFATYYC <u>QQTHSTPRGV</u> FGQGTREVK	B15
67C3-10	VH (SEQ ID NO:31) QVQLLDGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SYWMS</u> WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEK <u>YYVDSVKGR</u> RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>VALWDDAFDI</u> WGQGTMTV VSA VL (SEQ ID NO:32) DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC <u>RASQSISWLA</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>KASSLES</u> GV PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYC <u>QHSNSLPLT</u> FGGGTKVEIK	B16
67C2-23	VH (SEQ ID NO:33) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SNAMS</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>AVGGGGVNT</u> <u>YYADSVKGR</u> RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK <u>GEKGYNSCIDY</u> WGQGT VTVSA VL (SEQ ID NO:34) NIQLTQSPSSLSASVGDRTITC <u>QASQDISNYLN</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>DASNLET</u> GV PSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDFATYYC <u>QQYDNLPPFT</u> FGPGTKVDIK	B17

Пример 2. Анализ связывающих свойств антител против PDL1

[0093] 17 уникальных клонов были охарактеризованы и преобразованы в полноразмерный IgG. Их связывающие свойства проверяли с использованием рекомбинантного PD-L1 человека (Sino Biological, № в каталоге 10084-H08H).

[0094] Для оценки антигенсвязывающей активности антитела подвергали ИФА. Вкратце, титрационные микропланшеты покрывали белком PD-L1 человека в концентрации 1 мкг/мл в PBS, внося по 100 мкл/лунку, при 4°C в течение ночи, после

чего блокировали 100 мкл/лунку 1% BSA. В каждую лунку добавляли 4-кратные разведения гуманизированных антител, начиная с 10 мкг/мл, и инкубировали в течение 1–2 часов при КТ. Планшеты промывали ФСБ/Tween, а затем инкубировали с антителом козы против IgG человека, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 1 часа при КТ. После промывания планшеты проявляли с субстратом ТМВ и анализировали на спектрофотометре при OD 450 нм. Как показано на **Фиг. 1**, все антитела продемонстрировали эффективность связывания с PD-L1 человека. В частности, B03, B04, B05, B06, B07, B10, B12, B13, B14 и B16 продемонстрировали превосходное связывание с PD-L1 человека. Среди этих связавшихся соединений B04, B06, B07, B12 и B16 были сопоставимы с Tecentriq® (атезолизумабом), эталонным антителом против PD-L1, или превосходили его.

Пример 3. Функциональный анализ антитела против PDL1 на основе клеток

[0095] Для тестирования способности антител против PDL1 стимулировать Т-клеточный ответ использовали экспрессирующие hPD-1 клетки Jurkat. Jurkat представляет собой линию клеток Т-клеточного лейкоза человека, которые могут активировать экспрессию активированной люциферазы NF-AT при стимуляции TCR. В указанном анализе клетки Jurkat, трансфицированные геном PD-1 человека с использованием лентивируса, использовали в качестве реагирующих клеток. Клетки Raji-PD-L1 использовали в качестве антигенпрезентирующих клеток (АПК). Энтеротоксины стафилококков (SE) используют для стимуляции сигнала TCR. В указанной системе эктопически экспрессируемый huPDL1 может подавлять стимулированную SE активность люциферазы NF-AT клетками Jurkat, в то время как антитела против PDL1 могут устранять активность люциферазы NF-AT.

[0096] Вкратце, АПК ($2,5 \times 10^4$) культивировали совместно с экспрессирующими PD-1 Т-клетками Jurkat (1×10^5) при стимуляции SE. Антитела против PDL1 добавляли в начале культивирования. Через 6 ч в полученных клетках оценивали активность люциферазы. Как показано на **Фиг. 2**, антитела B04, B05, B06, B07, B10, B11, B12, B13, B14 и B16 блокировали PD1/PD-L1-опосредованную NF-AT-люциферазную активность в зависимости от дозы.

[0097] Для дальнейшей оценки функции PDL1-блокирующих антител выбранные антитела (B04, B06, B07, B10, B12, B16) подвергали дальнейшей оценке функции в

анализе с клетками Jurkat PD1 с использованием большего количества доз. Как показано на **Фиг. 3**, все эти антитела устраняли PD1/PDL1-опосредованное ингибирование люциферазы NF-AT в зависимости от дозы. Среди них B06, B07, B12 и B16 являлись наиболее эффективными антителами.

Пример 4. Проектирование устранения посттрансляционных модификаций (PTM)

[0098] Обычно в CDR-участках последовательностей антител человека присутствуют сайты посттрансляционных модификаций (PTM). Проверка последовательностей также позволила обнаружить потенциальную изомеризацию аспарагиновой кислоты (Asp) в DS или DG и сайты дезамидирования в B06, B12 или B16. Получили некоторые из этих аминокислотных замен (Таблица 1) и протестировали их. Протестированные последовательности также содержали некоторые обычные для терапевтических антител изменения в каркасных областях, например, серин на С-конце VH и последовательность DIQM на N-конце VL.

Таблица 2. Последовательности мутированных антител

B06	Последовательность АК (мутация выделена подчеркнутым шрифтом)
B06-01	VH (SEQ ID NO:121) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGST YYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGT ^{<u>LV</u>} TV <u>SS</u> VL (SEQ ID NO:12) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPKAPKLLIYAAS ^{<u>TL</u>} QSGV PDRFSGSGSGTDFTLT ^{<u>IT</u>} SSSLQAEDVAVYYCQQYLSVPYTFGQGTKVEIK
B06-02	VH (SEQ ID NO:122) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSESWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGST YYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGT ^{<u>LV</u>} TV <u>SS</u> VL (SEQ ID NO:12) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPKAPKLLIYAAS ^{<u>TL</u>} QSGV PDRFSGSGSGTDFTLT ^{<u>IT</u>} SSSLQAEDVAVYYCQQYLSVPYTFGQGTKVEIK
B06-03	VH (SEQ ID NO:123) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSESWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGST YYAD ^{<u>AV</u>} KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGT ^{<u>LV</u>} TV <u>SS</u> VL (SEQ ID NO:12) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPKAPKLLIYAAS ^{<u>TL</u>} QSGV PDRFSGSGSGTDFTLT ^{<u>IT</u>} SSSLQAEDVAVYYCQQYLSVPYTFGQGTKVEIK
B12	Последовательность АК (мутация выделена подчеркнутым шрифтом)
B12-01	VH (SEQ ID NO:124)

	QVQLLES GGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEK YYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVALWDDAFDIWGQGTMT VSS VL (SEQ ID NO:125) <u>DIQMT</u> QSPSTLSASVGDRVIITCRASRGISSWLAWYQQKPGKAPNLLISKASSLESGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSSSIPLTFGGGTKVEIK
B12-02	VH (SEQ ID NO:126) QVQLLES GGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQ <u>E</u> GSEK YYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVALWDDAFDIWGQGTMT VSS VL (SEQ ID NO:125) <u>DIQMT</u> QSPSTLSASVGDRVIITCRASRGISSWLAWYQQKPGKAPNLLISKASSLESGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSSSIPLTFGGGTKVEIK
B12-02a	VH (SEQ ID NO:128) QVQLLES GGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEK YYV <u>E</u> SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVALWDDAFDIWGQGTMT VSS VL (SEQ ID NO:125) <u>DIQMT</u> QSPSTLSASVGDRVIITCRASRGISSWLAWYQQKPGKAPNLLISKASSLESGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSSSIPLTFGGGTKVEIK
B12-03	VH (SEQ ID NO:140) QVQLLES GGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQ <u>E</u> GSEK YYVD <u>A</u> VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVALWDDAFDIWGQGTMT VSS VL (SEQ ID NO:125) <u>DIQMT</u> QSPSTLSASVGDRVIITCRASRGISSWLAWYQQKPGKAPNLLISKASSLESGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSSSIPLTFGGGTKVEIK
B12-03a	VH (SEQ ID NO:127) QVQLLES GGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQD <u>A</u> SEK YYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVALWDDAFDIWGQGTMT VSS VL (SEQ ID NO:125) <u>DIQMT</u> QSPSTLSASVGDRVIITCRASRGISSWLAWYQQKPGKAPNLLISKASSLESGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSSSIPLTFGGGTKVEIK

B16	Последовательность АК (мутация выделена подчеркнутым шрифтом)
B16-01	VH (SEQ ID NO:124) QVQLL <u>E</u> SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEK YYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVALWDDAFDIWGQGTMT VSS VL (SEQ ID NO:32) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGV PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHSNSLPLTFGGGTKVEIK
B16-02	VH (SEQ ID NO:128) QVQLL <u>E</u> SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEK YYV <u>E</u> SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVALWDDAFDIWGQGTMT VSS VL (SEQ ID NO:32) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGV PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHSNSLPLTFGGGTKVEIK
B16-03	VH (SEQ ID NO:127) QVQLL <u>E</u> SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQD <u>A</u> SEK YYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVALWDDAFDIWGQGTMT VSS VL (SEQ ID NO:32)

	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES PSRFGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHSNSLPLTFGGGTKVEIK
B16-04	VH (SEQ ID NO:128) QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEK YYV E SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVALWDDAFDIWGQGTMT VS S VL (SEQ ID NO:129) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES PSRFGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHSN A LPLTFGGGTKVEIK
B16-05	VH (SEQ ID NO:130) QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQD A SEK YYV E SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVALWDDAFDIWGQGTMT VS S VL (SEQ ID NO:129) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES PSRFGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHSN A LPLTFGGGTKVEIK
B16-06	VH (SEQ ID NO:128) QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEK YYV E SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVALWDDAFDIWGQGTMT VS S VL (SEQ ID NO:131) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES PSRFGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHS Q SLPLTFGGGTKVEIK
B16-07	VH (SEQ ID NO:130) QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQD A SEK YYV E SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVALWDDAFDIWGQGTMT VS S VL (SEQ ID NO:131) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES PSRFGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHS Q SLPLTFGGGTKVEIK

[0099] Для тестирования функциональной способности мутированных антител против PDL1 стимулировать Т-клеточный ответ использовали экспрессирующие hPD-1 клетки Jurkat, как описано выше. Как показано на **Фиг. 4**, все типичные мутанты обладали сопоставимыми функциональными характеристиками, что демонстрировало перспективность этих мутаций в отношении снижения вероятности посттрансляционных модификаций указанных антител.

Пример 5. Сравнение с эталонными антителами

[0100] Один из модифицированных вариантов B12, B12-01, использовали в качестве типичного антитела для сравнения с известными эталонными антителами против PD-L1. Эталонные антитела включали атезолизумаб (TecentriqTM), полностью гуманизированное моноклональное антитело изотипа IgG1 с конструированным Fc-фрагментом, и авелумаб (BavencioTM), полностью человеческое моноклональное антитело.

[0101] Клетки Jurkat, трансфицированные геном PD-1 человека с использованием лентивируса, использовали в качестве реагирующих клеток. Клетки Raji-PD-L1 использовали в качестве антигенпрезентирующих клеток (АПК). Энтеротоксины стафилококков (SE) используют для стимуляции сигнала TCR. В указанной системе эktopический экспрессируемый huPDL1 может подавлять стимулированную SE активность люциферазы NF-AT клетками Jurkat, в то время как антитела против PDL1 могут устранять активность люциферазы NF-AT.

[0102] АПК культивировали совместно с экспрессирующими PD-1 клетками Jurkat при стимуляции SE. Антитела против PDL1 добавляли в начале культивирования. Через 6 ч в полученных клетках оценивали активность люциферазы.

[0103] Результаты показаны на **Фиг. 5**. B12-01 демонстрировало значимо более высокую аффинность по сравнению с авелумабом (EC50: 0,098 нМ по сравнению с 0,27 нМ) в анализе на основе клеток и превосходило Tecentriq (EC50: 0,098 нМ по сравнению с 0,12 нМ).

[0104] Затем выполнили предварительный анализ характеристик потенциала для разработки лекарственных средств, в том числе чистоты (эксклюзионная хроматография (SEC)), изоэлектрической точки (pI), температуры плавления (Tm) и гидрофильности (хроматография с гидрофобным взаимодействием (HIC)) для B12-01 по сравнению с эталонным антителом Tecentriq. Результаты показаны ниже в **Таблице 3**.

Таблица 3. Сравнение потенциала для разработки лекарственных средств

Идентификационный номер образца	B12-01	Tecentriq
Эксклюзионная хроматография (% мономера)	93,79	99,61
pI	8,8	8,6
Кислотные (%)	35,6	38,7
Нейтральные (%)	58,7	47,7
Основные (%)	5,7	13,6
Tm pH=7,5 (°C)	68,5/78,0	59,5/81,5
HIC (NH ₄) ₂ SO ₄ (M)	1,01	0,41

[0105] Интересно, что результаты показали, что B12-01 обладал более высокой гидрофильностью по сравнению с Tecentriq. Различие в гидрофильности может быть обусловлено их различным аминокислотным составом и указывает, что B12-01

характеризовался большей растворимостью в воде по сравнению с Tecentriq. Это свойство повышает гибкость разработки составов на следующей стадии СМС.

Пример 6. Аффинность связывания согласно Biacore

[0106] В данном примере оценивали аффинность B12-01 по отношению к PD-L1 человека с His-маркером с помощью Biacore T200.

[0107] Анализируемые соединения B12-01 захватывали на чипе с белком А. Белок PD-L1 человека (25 нМ-1,56 нМ) вводили к захваченному анализируемому соединению со скоростью потока of 10 мкл/мин. Лиганду позволяли ассоциировать в течение 120 с и диссоциировать в течение 600 с. Данные показали, что B12-01 обладало аффинностью к PD-L1 на субнанолярном уровне ($9,48 \times 10^{-10}$ М, Фиг. 6).

Пример 7. Межвидовая реакционная способность

[0108] В данном примере проверяли связывающую активность антител по отношению к белкам PDL1 различных видов животных

[0109] Белки PDL1-His человека, яванского макака, крысы и мыши иммобилизовали из расчета 0,5 мкг/мл при 4°C в течение ночи. B12-01 последовательно разбавляли в соотношении 1:3, начиная от концентрации 10 мкг/мл, и инкубировали с различными антигенами PDL1 в течение одного часа при КТ. Планшеты промывали, а затем инкубировали с антителом мыши против Fc IgG человека, конъюгированным с HRP, с последующим проявлением с помощью субстрата ТМВ и анализировали с помощью спектрофотометра при OD 450 нм. Как показано на Фиг. 7, B12-01 обладало сопоставимой способностью к связыванию с PD-L1 человека и PD-L1 яванского макака. Специфичного связывания B12-01 с PDL1 крысы или мыши не наблюдали.

Пример 8. Блокирование взаимодействия PD1-PDL1

[0110] В данном примере использовали анализ блокирования на основе клеток Raji-PDL1 для оценки способности антител против PDL1 блокировать связывание белка PD1 с его клеточным лигандом PDL1.

[0111] Клетки Raji, сверхэкспрессирующие PDL1 человека, высевали в 96-луночные планшеты при концентрации 1×10^5 клеток/луночку. Антитело B12-01 и изотипическое

контрольное IgG последовательно разбавляли с концентрации 10 мкг/мл (1:3, 10 доз) буфером для FACS и инкубировали с клетками в течение 30 мин на льду. После промывки разбавленный биотинилированный белок PD1 человека с авидином и His-маркером (3 мкг/мл) инкубировали с комплексом «антитело-клетки» в течение 30 мин на льду с последующим обнаружением с помощью антитела со стрептавидином-PE. Флуоресценцию измеряли посредством проточной цитометрии и анализировали с помощью программного обеспечения Flowjo, определяя среднюю интенсивность флуоресценции (MFI). Данные показали, что антитело B12-01 обладало выраженной способностью блокировать связывание белка PD1 с PDL1 на поверхности клетки (Фиг. 8).

Пример 9. Влияние на активацию Т-клеток *in vitro*

[0112] В данном примере оценивали влияние антител против PDL1 на активацию Т-клеток *in vitro* с использованием анализа реакции смешанной культуры первичных лимфоцитов человека (MLR).

[0113] Вкратце, CD14⁺ моноциты выделяли из МПК одного донора-человека и стимулировали ГМ-КСФ и ИЛ-4 в течение 7 с целью дифференцировки в незрелые дендритные клетки (imDC). 2×10⁵/мл CD4⁺ Т-клеток из МПК другого донора-человека (1×10⁵/лунку) совместно культивировали с imDC (1×10⁴/лунку) в присутствии последовательно разбавленного антитела против PDL1 в течение 5 дней. Концентрацию ИФН-γ в супернатанте измеряли посредством ИФА. Результат показал, что B12-01 значительно стимулировали активацию Т-клеток человека, согласно измеренному уровню ИФНγ в культуральной среде (Фиг. 9).

Пример 10. Эффективность антитела против PDL1 *in vivo*

[0114] В данном примере использовали мышей, трансгенных по внеклеточному домену (ECD) PDL1 человека, для оценки эффективности антитела против PDL1 *in vivo*.

[0115] Клетки аденокарциномы толстой кишки мыши MC38, модифицированные с целью экспрессии PDL1 человека (MC38-hPD-L1), подкожно имплантировали hPDL1-гуманизированным мышам. Мышей разделили на две группы по достижении опухоли объема приблизительно 100 мм³, и внутрибрюшинно вводили антитело B12-01 или изотипический IgG-контроль в дозе 10 мг/кг каждые 3 дня, в общей сложности 6 раз.

Объем опухолей отслеживали во время эксперимента путем измерения штангенциркулем два раза в неделю. Результат показал, что B12-01 эффективно ингибировало рост опухоли по сравнению с группой IgG (Фиг. 10).

* * *

[0116] Рамки настоящего изобретения не ограничиваются конкретными описанными вариантами реализации, которые следует рассматривать как одиночную иллюстрацию отдельных аспектов настоящего изобретения, и любые функционально эквивалентные композиции и способы входят в рамки настоящего изобретения. Для специалиста понятно, что в способы и композиции согласно настоящему изобретению можно внести различные модификации и изменения, не выходя за рамки сущности изобретения. Таким образом, подразумевается, что настоящее изобретение включает модификации и изменения данного изобретения при условии, что они соответствуют сущности прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов.

[0117] Все публикации и патентные заявки, упоминаемые в настоящем описании, включены в настоящую заявку посредством ссылок в той же степени, как если бы каждая индивидуальная публикация или патентная заявка была конкретным и индивидуальным образом указана как включенная посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанные антитело или его фрагмент обладают специфичностью в отношении белка лиганда-1 запрограммированной гибели клеток (PD-L1) человека и содержат переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, причем:

VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37,

VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, 135, 136, 137, 143 или 144,

VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63,

VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76,

VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83 и

VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97.

2. Антитело или его фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что:

VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37,

VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46,

VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63,

VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76,

VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83 и

VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97.

3. Антитело или его фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что указанная VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, 124, 126, 127, 128, 130, 140 или 145, и указанная VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24 или 125.

4. Антитело или его фрагмент по п. 1 или 2, отличающиеся тем, что указанная VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:124 или первую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:124, и указанная VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125 или вторую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:125.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанные антитело или его фрагмент обладают специфичностью в отношении белка лиганда-1 запрограммированной гибели клеток (PD-L1) человека и содержат переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, причем:

VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38 или 132,

VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, 133 или 134,

VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57,

VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72,

VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84 и

VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:93.

6. Антитело или его фрагмент по п. 5, отличающиеся тем, что указанная VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, 121, 122 или 123, или первую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, 121, 122 или 123, и указанная VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12 или вторую

аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:12.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанные антитело или его фрагмент обладают специфичностью в отношении белка лиганда-1 запрограммированной гибели клеток (PD-L1) человека и содержат переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, причем:

VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37,

VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, 135, 136, 137, 143 или 144,

VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63,

VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71,

VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83 и

VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:101, 138 или 139.

8. Антитело или его фрагмент по п. 7, отличающиеся тем, что указанная VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, 124, 126, 127, 128, 130, 140 или 145, или первую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 31, 124, 126, 127, 128, 130, 140 или 145, и указанная VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, 129 или 131 или вторую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:32, 129 или 131.

9. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-8, дополнительно содержащие константную область тяжелой цепи, константную область легкой цепи, Fc-область или их комбинацию.

10. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1–9, отличающиеся тем, что указанное антитело или его фрагмент представляет собой полностью человеческое антитело.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанные антитело или его фрагмент обладают специфичностью в отношении белка лиганда-1 запрограммированной гибели клеток (PD-L1) человека и содержат:

VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:35-42 и их вариантов, имеющих одну или две аминокислотные замены,

VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:43-51 и их вариантов, имеющих одну или две аминокислотные замены,

VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:52-66 и их вариантов, имеющих одну или две аминокислотные замены,

VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:67-79 и их вариантов, имеющих одну или две аминокислотные замены,

VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:80-88 их вариантов, имеющих одну или две аминокислотные замены, и

VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:89-102 и их вариантов, имеющих одну или две аминокислотные замены.

12. Антитело или его фрагмент по п. 11, отличающиеся тем, что:

VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:37- 38, 40 и 132,

VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:45-47, 49, 133-137 и 143-144,

VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:54-58 и 61-64,

VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:67, 70-73 и 75-77,

VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:80, 83-84 и 86, и

VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:89, 91-94, 96-99, 101 и 138-139.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанные антитело или его фрагмент обладают специфичностью в отношении белка лиганда-1 запрограммированной гибели клеток (PD-L1) человека и содержат переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, причем указанные VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, соответственно, содержат аминокислотные последовательности:

SEQ ID NO:35, 43, 52, 67, 80 и 89;

SEQ ID NO:36, 44, 53, 68, 81 и 90;

SEQ ID NO:37, 45, 54, 69, 82 и 91;

SEQ ID NO:37, 46, 55, 70, 83 и 89;
 SEQ ID NO:37, 46, 56, 71, 83 и 92;
 SEQ ID NO:38, 47, 57, 72, 84 и 93;
 SEQ ID NO:37, 46, 58, 73, 83 и 94;
 SEQ ID NO:39, 48, 59, 74, 85 и 95;
 SEQ ID NO:37, 46, 60, 67, 80 и 91;
 SEQ ID NO:37, 46, 61, 75, 83 и 96;
 SEQ ID NO:40, 49, 62, 67, 80 и 91;
 SEQ ID NO:37, 46, 63, 76, 83 и 97;
 SEQ ID NO:37, 46, 64, 71, 86 и 98;
 SEQ ID NO:37, 45, 54, 77, 80 и 99;
 SEQ ID NO:41, 50, 65, 78, 87 и 100;
 SEQ ID NO:37, 46, 63, 71, 83 и 101; или
 SEQ ID NO:42, 51, 66, 79, 88 и 102.

причем каждая из указанных аминокислотных последовательностей необязательно содержит аминокислотную замену.

14. Биспецифичное антитело, содержащее первый антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–13 и второй антигенсвязывающий фрагмент, обладающий специфичностью в отношении антигена, не являющегося PD-L1.

15. Композиция, содержащая антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

16. Один или более полинуклеотидов, кодирующих антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-14.

17. Выделенная клетка, содержащая один или более полинуклеотидов, кодирующих антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-14.

18. Способ лечения рака или инфекции у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение указанному пациенту эффективного количества антитела или его фрагмента по любому из пп. 1–14 или композиции по п. 15.

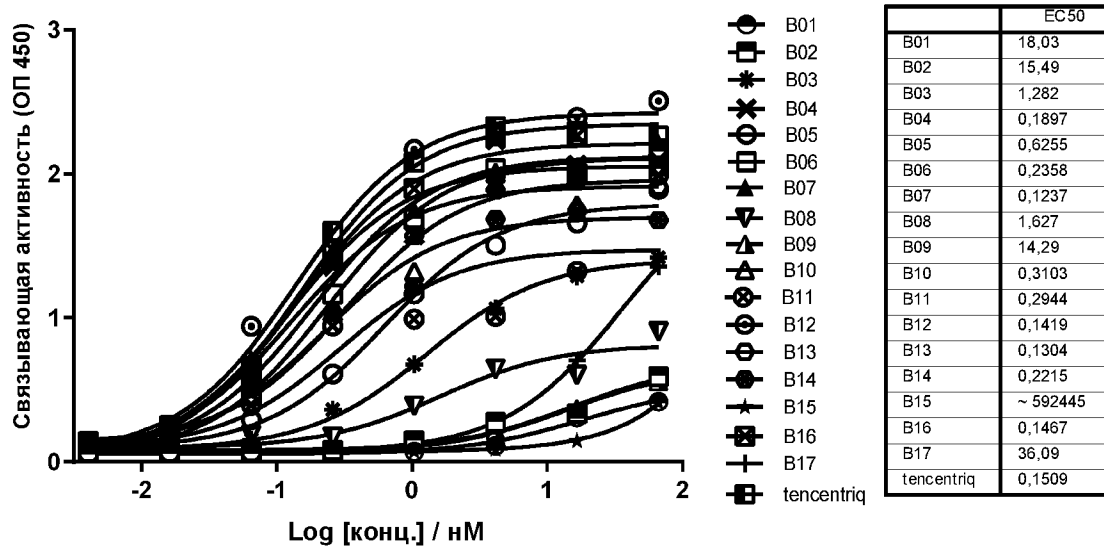
19. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп. 1–14 или композиции по п. 15 для получения лекарственного средства для лечения рака или инфекции.

20. Способ по п. 18 или применение по п. 19, отличающиеся тем, что указанный рак представляет собой солидную опухоль.

21. Способ или применение по п. 20, отличающиеся тем, что 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 легкого, немелкоклеточного рака легкого, 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.

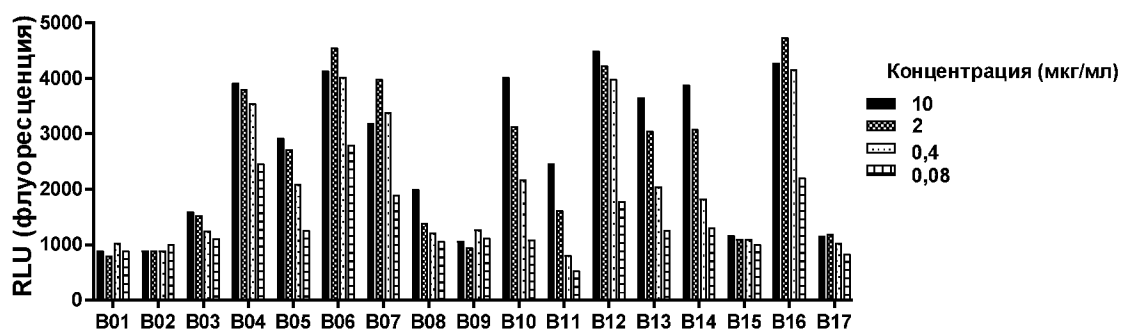
22. Способ по п. 18 или применение по п. 19, отличающиеся тем, что указанная инфекция представляет собой вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию или паразитарную инфекцию.

Связывание PDL1 на основе ИФА

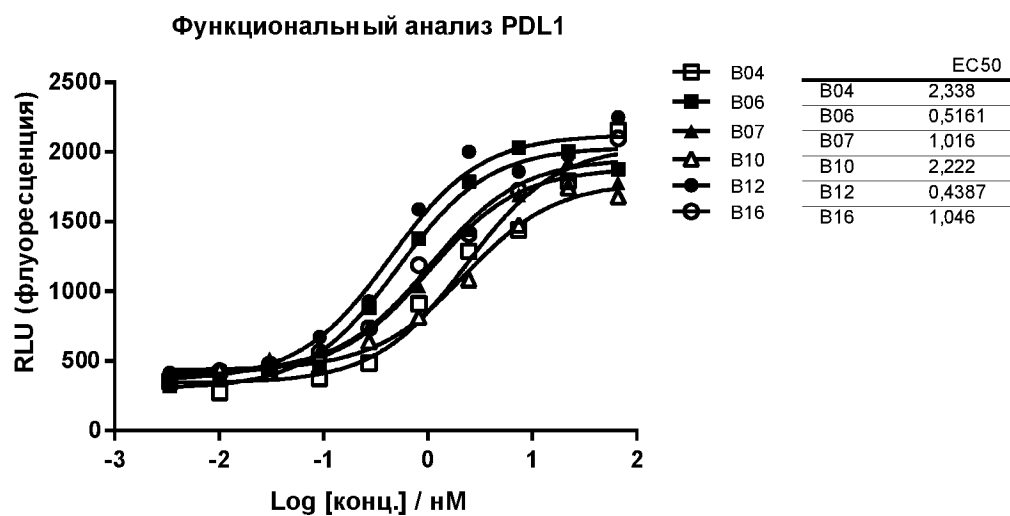


ФИГ. 1

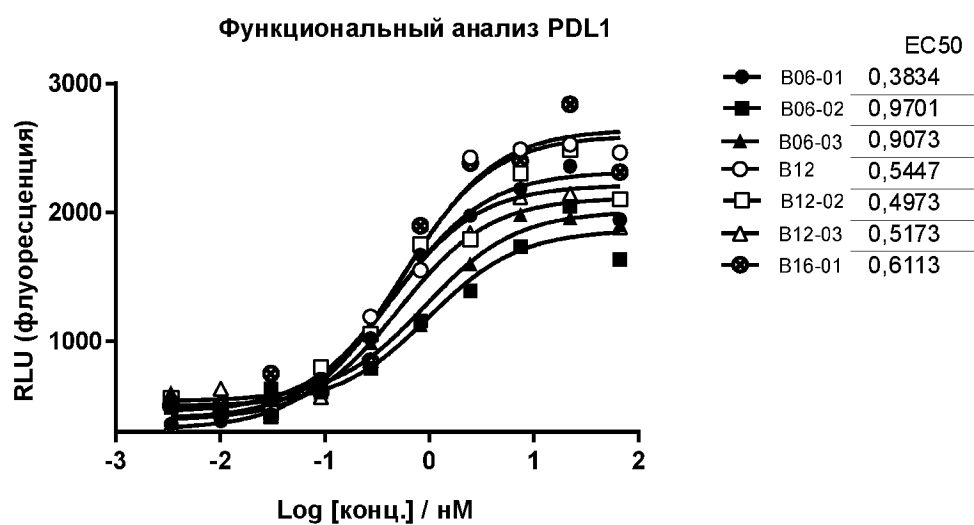
Функциональный анализ PDL1



ФИГ. 2

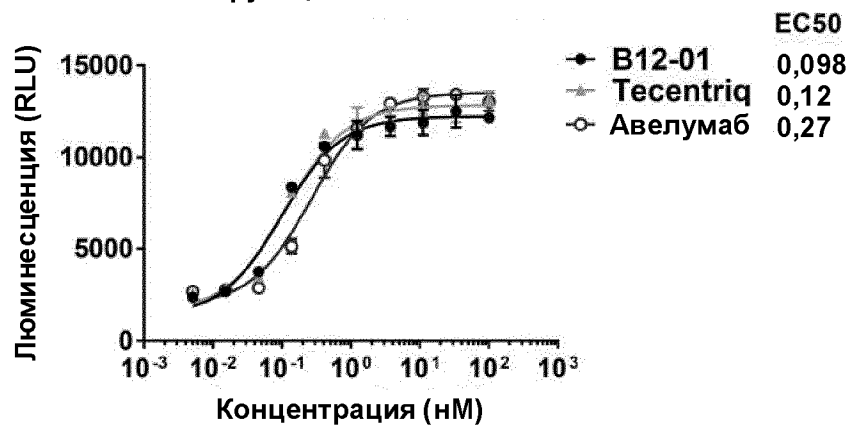


ФИГ. 3



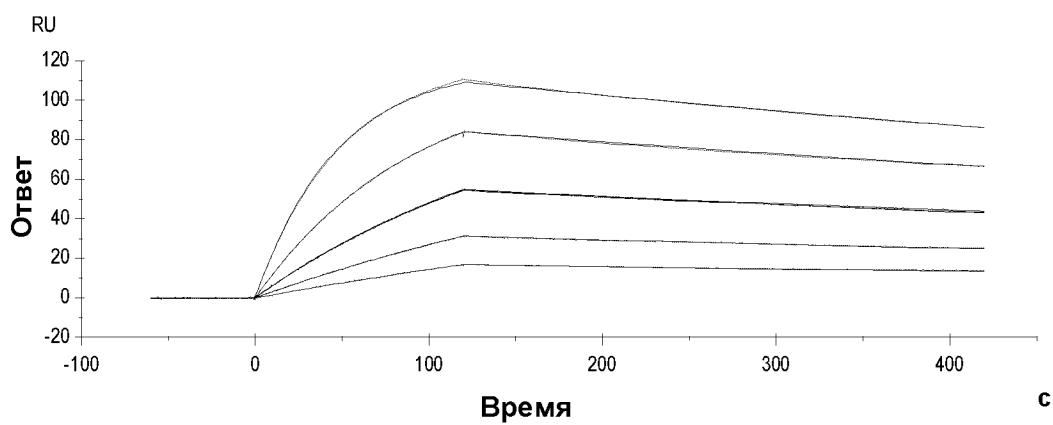
ФИГ. 4

Анализ функции PDL1 на основе клеток



ФИГ. 5

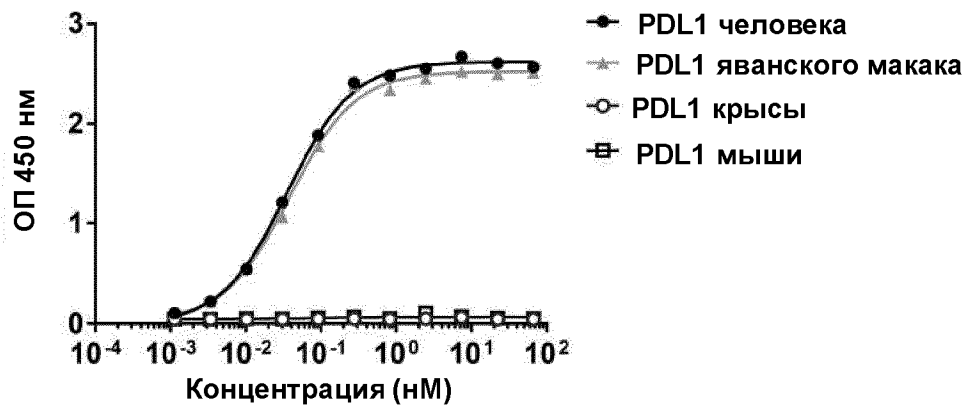
Аффинность PD-L1



Лиганд Анализируемые соед.	hPD-L1-his		
	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)
B12-01	8,38E+5	7,95E-4	9,48E-10

ФИГ. 6

ИФА связывания

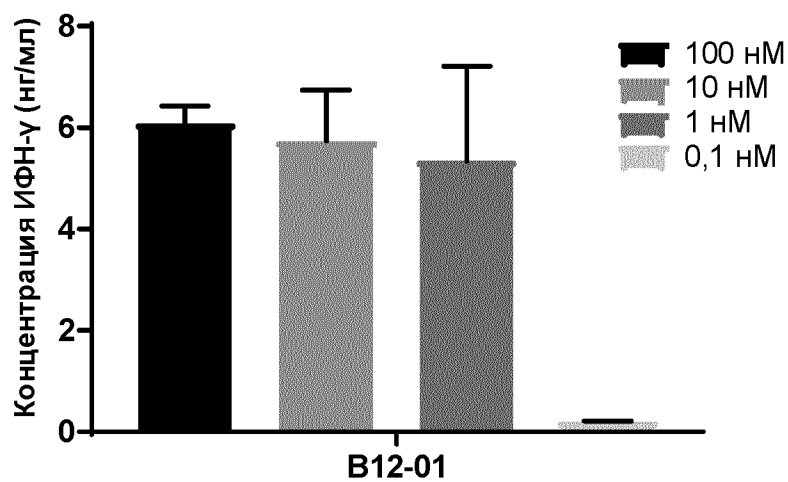


ФИГ. 7

Анализ блокирования рецептора PDL1
на основе клеток

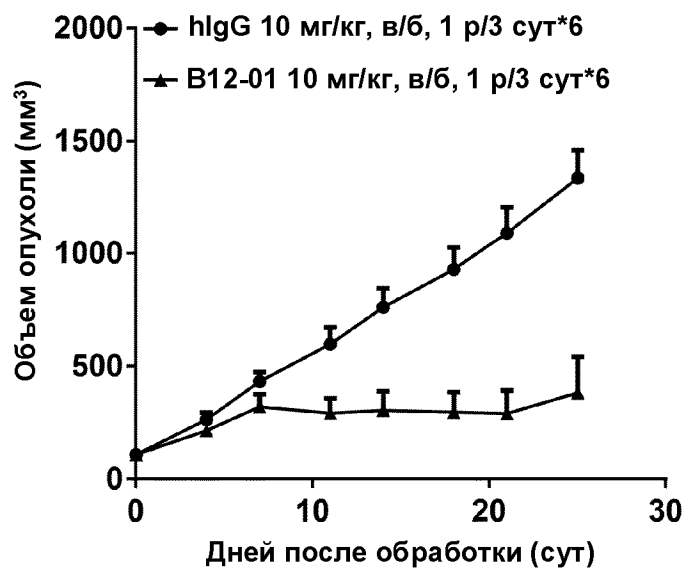
ФИГ. 8

MFR-анализ



ФИГ. 9

Объем опухоли



ФИГ. 10