

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290943** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.08.08

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.10.02

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-L1 И КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ
СРЕДСТВО**

(31) **62/910,988**

(32) **2019.10.04**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/054037**

(87) **WO 2021/067776 2021.04.08**

(88) **2021.05.20**

(71) Заявитель:
СИДЖЕН ИНК. (US)

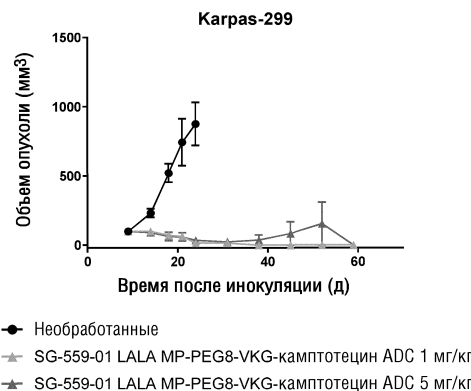
(72) Изобретатель:

**Кван Байрон Хуа, Ван Эппс Хизер,
Уэйт Эндрю, Джеффри Скотт, Лиски
Райан (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Предложены новые антитела против PD-L1 и конъюгаты антитело-лекарственное средство, а также способы применения таких антител против PD-L1 и конъюгатов антитело-лекарственное средство для лечения онкологического заболевания.



202290943

A1

A1

202290943

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573531EA/032

АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-L1 И КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании заявки на патент № 62/910988, поданной 4 октября 2019 г., которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее изобретение относится к новым антителам против PD-L1 и конъюгатам антитело-лекарственное средство, а также к способам применения таких антител против PD-L1 и конъюгатов антитело-лекарственное средство для лечения онкологического заболевания.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] PD-L1, также известный как лиганд 1 программируемой клеточной смерти 1, B7-H1 или CD274, представляет собой белок, который, как было показано, экспрессируется в различных опухолевых клетках. PD-L1 представляет собой трансмембранный белок, который может взаимодействовать с PD-1 и действовать как «выключатель» для инактивации Т-клеток. PD-L1 обычно сверхэкспрессируется на опухолевых клетках, и связывание с PD-1 позволяет опухолям избегать Т-клеточного иммунного ответа.

[0003] Есть несколько видов опухолей, клетки которых экспрессируют PD-L1, включая меланому. Меланома представляет собой самый опасный вид рака кожи. В 2015 году насчитывалось 3,1 миллиона человек с активным заболеванием, и меланома привела к смерти 59800 человек. Пятилетняя выживаемость при IV стадии заболевания составляет меньше 10%, а медиана выживаемости составляет всего 6-12 месяцев. Следовательно, существует потребность в улучшенных методах лечения меланомы, а также других видов онкологических заболеваний, при которых экспрессируется PD-L1. Один из видов лечения онкологического заболевания, при котором экспрессируется PD-L1, включает введение антител против PD-L1 в качестве иммунотерапии. Иммуноонкология является многообещающей областью лечения онкологического заболевания, но есть возможности для улучшения существующих методов лечения.

[0004] Все ссылки, цитируемые в настоящем описании, включая патентные заявки, патентные публикации и научную литературу, полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме, как если бы каждая отдельная ссылка была конкретно и отдельно указана для включения в качестве ссылки.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В настоящем документе предложены антитела против PD-L1 и конъюгаты антитело-лекарственное средство, направленное против PD-L1 (ADC). В частности, в настоящем документе предложены ADC камптотецина, направленные на PD-L1, и ADC

MMAE. В настоящем документе также предложены способы применения направленных против PD-L1 антител и ADC для лечения расстройств, при которых экспрессируется PD-L1. Предпочтительные антитела против PD-L1 демонстрируют аффинность связывания с человеческим белком PD-L1, которая составляет от 3 нМ до 300 нМ. Другие предпочтительные антитела против PD-L1 содержат последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 3-5 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 6-8, где антитела содержат одну или больше аминокислотных замен в пределах одной или больше CDR. Другие предпочтительные антитела против PD-L1 содержат последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 13-15 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 16-18.

[0006] В настоящем описании также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с человеческим белком лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1), где антитело демонстрирует аффинность связывания с человеческим белком PD-L1, которая составляет от 3 до 300 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело демонстрирует аффинность связывания с человеческим белком PD-L1, которая составляет от 3 до 15 нМ.

[0007] В некоторых вариантах осуществления антитело также демонстрирует более высокую общую интернализацию, чем общая интернализация Ab1. В некоторых вариантах осуществления общая интернализация составляет от 9% до 155% увеличения AUC относительно AUC Ab1. В некоторых вариантах осуществления общую интернализацию определяют с помощью анализа интернализации FabFluor.

[0008] В некоторых вариантах осуществления антитело также демонстрирует x50, которое меньше, чем x50 Ab1. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с монометилауристатином E (MMAE), где x50 составляет от 3 нг/мл до 20 нг/мл в клеточной линии MDA-MB-231.

[0009] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с камптотецином, и где x50 составляет от 15 нг/мл до 55 нг/мл в клеточной линии MDA-MB-231.

[0010] В некоторых вариантах осуществления антитело включает последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 13-15 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 16-18.

[0011] В некоторых вариантах осуществления антитело включает последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 3-5 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 6-8, где антитело включает одну или больше аминокислотных замен в одной или больше CDR.

[0012] В некоторых вариантах осуществления антитело включает последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело

включает последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело включает последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело включает последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 11 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 12.

[0013] В некоторых вариантах осуществления антитело включает легкую цепь SEQ ID NO: 9 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 10.

[0014] В некоторых вариантах осуществления фрагмент представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH, Fv, диатело, линейное антитело или фрагмент одноцепочечного антитела.

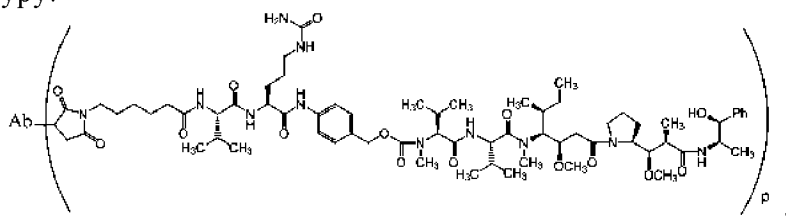
[0015] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит мутации L234A и L235A в тяжелой цепи антитела.

[0016] В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG1.

[0017] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное или химерное антитело.

[0018] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом через линкер.

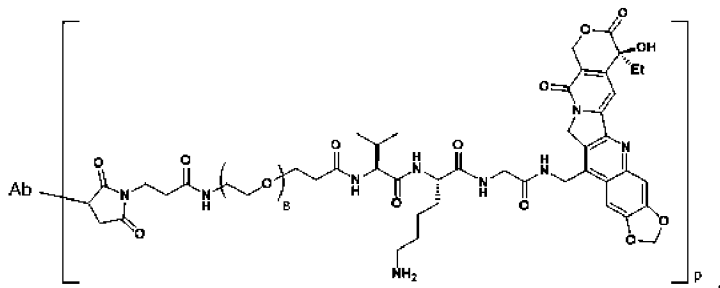
[0019] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с монометилауристатином E (MMAE). В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с MMAE через расщепляемую ферментом линкерную единицу. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая ферментом линкерная единица включает линкер Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с MMAE через линкер, образуя конъюгат антитело-лекарственное средство, имеющий структуру:



где Ab представляет собой антитело, а p находится в диапазоне от 2 до 10. В некоторых вариантах осуществления p равно 4. В некоторых вариантах осуществления p равно 8.

[0020] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с камптотецином. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с

камптотецином через расщепляемую ферментом линкерную единицу. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая ферментом линкерная единица включает линкер Val-Lys-Gly. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с камптотецином через линкер, образуя конъюгат антитело-лекарственное средство, имеющий структуру:



где Ab представляет собой антитело, а p находится в диапазоне от 2 до 10. В некоторых вариантах осуществления p равно 4. В некоторых вариантах осуществления p равно 8.

[0021] В настоящем описании также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с человеческим белком PD-L1, где антитело включает последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 3-5 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 6-8, где антитело включает одну или больше аминокислотных замен в одной или больше CDR.

[0022] В некоторых вариантах осуществления антитело демонстрирует аффинность связывания с человеческим белком PD-L1, которая составляет от 3 до 300 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело демонстрирует аффинность связывания с человеческим белком PD-L1, которая составляет от 3 до 15 нМ.

[0023] В некоторых вариантах осуществления антитело также демонстрирует более высокую общую интернализацию, чем общая интернализация Ab1. В некоторых вариантах осуществления общая интернализация составляет от 9% до 155% увеличения AUC по сравнению с AUC Ab1. В некоторых вариантах осуществления общую интернализацию определяют с помощью анализа интернализации FabFluor.

[0024] В некоторых вариантах осуществления антитело также имеет значение x_{50} , превышающее значение x_{50} Ab1.

[0025] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с монометилауристатином E (MMAE), и где x_{50} составляет от 3 нг/мл до 20 нг/мл в клеточной линии MDA-MB-231.

[0026] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с камптотецином, и где x_{50} составляет от 15 нг/мл до 55 нг/мл в клеточной линии MDA-MB-231.

[0027] В некоторых вариантах осуществления антитело включает последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 13-15 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 16-18. В некоторых вариантах осуществления антитело включает

последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело включает последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело включает последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело включает последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 11 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 12.

[0028] В некоторых вариантах осуществления антитело включает легкую цепь SEQ ID NO: 9 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 10.

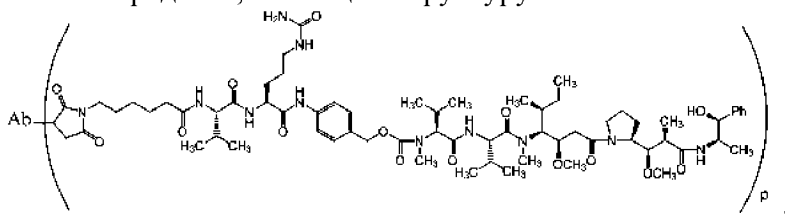
[0029] В некоторых вариантах осуществления фрагмент представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH, Fv, диатело, линейное антитело или фрагмент одноцепочечного антитела.

[0030] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит мутации L234A и L235A в тяжелой цепи антитела.

[0031] В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG1.

[0032] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное или химерное антитело.

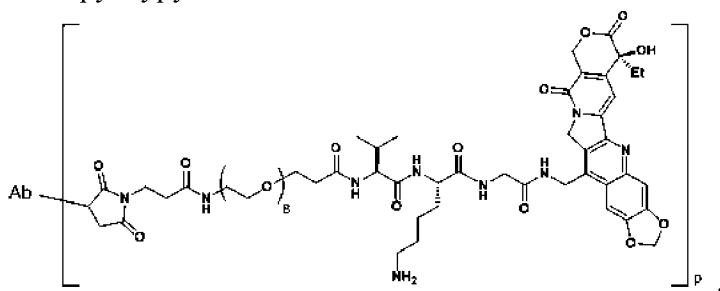
[0033] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом через линкер. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с монометилауристатином Е (ММАЕ). В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с ММАЕ через расщепляемую ферментом линкерную единицу. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая ферментом линкерная единица включает линкер Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с ММАЕ через линкер, образуя конъюгат антитело-лекарственное средство, имеющий структуру:



где Ab представляет собой антитело, а p находится в диапазоне от 2 до 10. В некоторых вариантах осуществления p равно 4. В некоторых вариантах осуществления p

равно 8.

[0034] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с камптотецином. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с камптотецином через расщепляемую ферментом линкерную единицу. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая ферментом линкерная единица включает линкер Val-Lys-Gly. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с камптотецином через линкер, образуя конъюгат антитело-лекарственное средство, имеющий структуру:



где Ab представляет собой антитело, а p находится в диапазоне от 2 до 10. В некоторых вариантах осуществления p равно 4. В некоторых вариантах осуществления p равно 8.

[0035] Также в настоящем документе предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с человеческим белком PD-L1, где антитело включает последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 13-15 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 16-18.

[0036] В некоторых вариантах осуществления антитело демонстрирует аффинность связывания с человеческим белком PD-L1, которая составляет от 3 до 300 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело демонстрирует аффинность связывания с человеческим белком PD-L1, которая составляет от 3 до 15 нМ.

[0037] В некоторых вариантах осуществления антитело также демонстрирует более высокую общую интернализацию, чем общая интернализация Ab1. В некоторых вариантах осуществления общая интернализация составляет от 9% до 155% увеличения AUC по сравнению с AUC Ab1. В некоторых вариантах осуществления общую интернализацию определяют с помощью анализа интернализации FabFluor.

[0038] В некоторых вариантах осуществления антитело также имеет значение x50, превышающее значение x50 Ab1.

[0039] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с метилэтилкетонами монометилауристатина Е (ММАЕ), и где x50 составляет от 3 нг/мл до 20 нг/мл в клеточной линии MDA-MB-231.

[0040] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с камптотецином, и где x50 составляет от 15 нг/мл до 55 нг/мл в клеточной линии MDA-MB-231.

[0041] В некоторых вариантах осуществления антитело включает

последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело включает последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело включает последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело включает последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 11 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 12.

[0042] В некоторых вариантах осуществления антитело включает легкую цепь SEQ ID NO: 9 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 10.

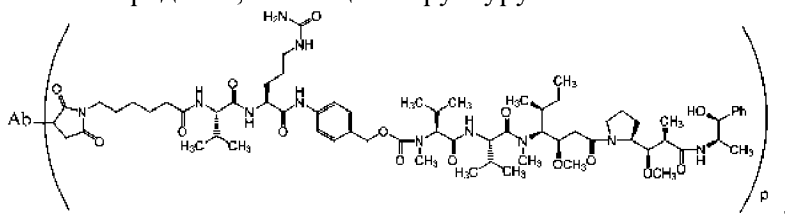
[0043] В некоторых вариантах осуществления фрагмент представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH, Fv, диатело, линейное антитело или фрагмент одноцепочечного антитела.

[0044] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит мутации L234A и L235A в тяжелой цепи антитела.

[0045] В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG1.

[0046] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное или химерное антитело.

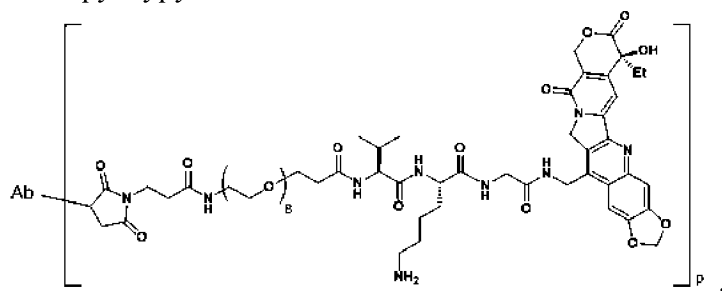
[0047] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом через линкер. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с монометилауристатином Е (ММАЕ). В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с ММАЕ через расщепляемую ферментом линкерную единицу. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая ферментом линкерная единица включает линкер Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с ММАЕ через линкер, образуя конъюгат антитело-лекарственное средство, имеющий структуру:



где Ab представляет собой антитело, а p находится в диапазоне от 2 до 10. В некоторых вариантах осуществления p равно 4. В некоторых вариантах осуществления p

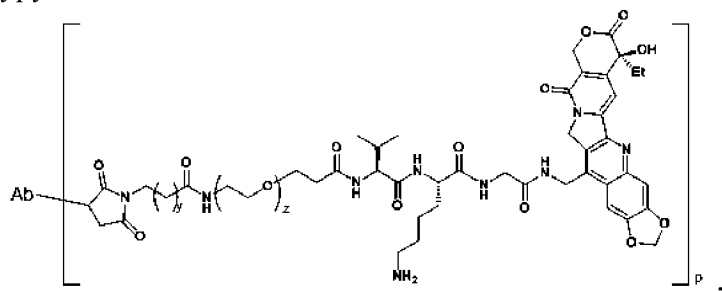
равно 8.

[0048] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с камптотецином. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с камптотецином через расщепляемую ферментом линкерную единицу. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая ферментом линкерная единица включает линкер Val-Lys-Gly. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с камптотецином через линкер, образуя конъюгат антитело-лекарственное средство, имеющий структуру:



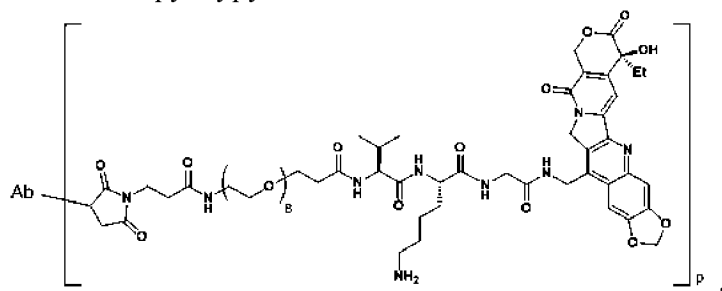
где Ab представляет собой антитело, а p находится в диапазоне от 2 до 10. В некоторых вариантах осуществления p равно 4. В некоторых вариантах осуществления p равно 8.

[0049] В настоящем описании также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с человеческим белком PD-L1, где антитело конъюгировано с камптотецином, образуя конъюгат антитело-лекарственное средство, где конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру:



где Ab представляет собой антитело против PD-L1; y равно 1, 2, 3 или 4 или равно 1 или 4; и z представляет собой целое число от 2 до 12 или равно 2, 4, 8 или 12; и p равно 1-16.

[0050] В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру:



[0051] В некоторых вариантах осуществления p составляет от 2 до 10.

[0052] В настоящем описании также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с человеческим белком лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1), где антитело демонстрирует аффинность связывания с человеческим белком PD-L1, которая выше, чем у Ab1. В некоторых вариантах осуществления антитело демонстрирует аффинность связывания, превышающую 2,7 нМ.

[0053] В настоящем описании также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с человеческим белком лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1), где антитело демонстрирует k_{assoc} к человеческому белку PD-L1, которая меньше, чем у Ab1. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет k_{assoc} к человеческому белку PD-L1, которая составляет меньше $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

[0054] В настоящем описании также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с человеческим белком лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1), где антитело демонстрирует K_{Dissoc} в отношении человеческого белка PD-L1, которая выше, чем у Ab1. В некоторых вариантах осуществления антитело демонстрирует K_{Dissoc} в отношении человеческого белка PD-L1, которая выше $2 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$.

[0055] В настоящем описании также предложены конъюгаты антитело-лекарственное средство, включающие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с человеческим белком PD-L1, где антитело включает последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 3-5 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 6-8, где антитело включает одну или больше аминокислотных замен в одной или больше CDR, и где антитело демонстрирует аффинность связывания с человеческим белком PD-L1, которая составляет от 5 нМ до 15 нМ, и где антитело конъюгировано с MMAE.

[0056] В настоящем описании также предложены конъюгаты антитело-лекарственное средство, включающие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с человеческим белком PD-L1, где антитело включает последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 3-5 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 6-8, где антитело включает одну или больше аминокислотных замен в одной или больше CDR, и где антитело демонстрирует аффинность связывания с человеческим белком PD-L1, которая составляет от 5 нМ до 15 нМ, и где антитело конъюгировано с камптотецином.

[0057] Также в настоящем описании предложены фармацевтические композиции, которые включают терапевтически эффективное количество описанных в настоящем документе антител и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[0058] В настоящем описании также предложены способы лечения онкологического заболевания у пациента, включая введение пациенту любого из антител,

описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления пациентом является человек. В некоторых вариантах осуществления онкологическое заболевание представляет собой меланому, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), мелкоклеточный рак легкого (SCLC), рак головы и шеи, тройной негативный рак молочной железы (TNBC), рак яичников, уротелиальный рак, гепатоцеллюлярную карциному (HCC), рак желудка или рак шейки матки.

[0059] В настоящем описании также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие любое из описанных в настоящем документе антител.

[0060] Также в настоящем описании предложены векторы, включающие любую из описанных в настоящем документе нуклеиновых кислот.

[0061] Также в настоящем описании предложены любые клетки-хозяева, описанные в настоящем документе, которые включают любую из нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO).

[0062] В настоящем описании также предложены способы получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с человеческим белком PD-L1, включая культивирование любой из клеток-хозяев, описанных в настоящем документе, в условиях, подходящих для получения антитела.

[0063] Также в настоящем описании предложены способы получения конъюгата антитело-лекарственное средство, который специфически связывается с человеческим белком PD-L1, включая культивирование любой из клеток-хозяев, описанных в настоящем документе, в условиях, подходящих для продукции антитела; и конъюгацию антитела с цитотоксическим агентом. В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой MMAE или камптотецин.

[0064] В настоящем описании также предложено применение любого из антител против PD-L1 или любого из конъюгатов антитело-лекарственное средство, описанных в настоящем документе, для применения в производстве лекарственного средства для лечения онкологического заболевания (например, онкологического заболевания, ассоциированного с экспрессией PD-L1⁺).

[0065] В настоящем описании также предложены антитела против PD-L1, описанные в настоящем документе, или конъюгаты антитело-лекарственное средство, описанные в настоящем документе, для применения при лечении онкологического заболевания (например, онкологического заболевания, ассоциированного с экспрессией PD-L1⁺).

[0066] В настоящем описании также предложены антитела против PD-L1, описанные в настоящем документе, или конъюгаты антитело-лекарственное средство, описанные в настоящем документе, для применения в медицине.

[0067] В настоящем описании также предложены способы уничтожения PD-L1⁺ клетки у пациента, причем способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества любого из антител против PD-L1, описанных в настоящем

документе, или любого из описанных конъюгатов антитело-лекарственное средство.

[0068] Также в настоящем документе предложено применение любого из антител против PD-L1, описанных в настоящем документе, или любого из конъюгатов антитело-лекарственное средство, описанных в настоящем документе, для применения в производстве лекарственного средства для уничтожения PD-L1⁺клетки у пациента.

[0069] В настоящем описании также предложены способы уменьшения объема солидной опухоли (например, PD-L1⁺солидной опухоли) у пациента, которые включают введение пациенту терапевтически эффективного количества любого из описанных в настоящем документе антител против PD-L1 или любого из описанных в настоящем документе конъюгатов антитело-лекарственное средство.

[0070] В настоящем документе также предложено применение любого из антител против PD-L1, описанных в настоящем документе, или любого из конъюгатов антитело-лекарственное средство, описанных в настоящем документе, для применения в производстве лекарственного средства для уменьшения объема солидной опухоли (например, PD-L1⁺солидной опухоли) у пациента.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0071] На ФИГ. 1 показан пример аминокислотных остатков Ab1, выбранных для мутации.

[0072] На ФИГ. 2A-2F показана цитотоксичность SG-559-xx ADC в нескольких клеточных линиях.

[0073] На ФИГ. 3A-3B показана интернализация SG-559-01 и SG-559-03 по сравнению с контрольными антителами.

[0074] На ФИГ. 4A-4B показана противоопухолевая активность SG-559-xx ADC в мышинной модели MDA-MB-231.

[0075] На ФИГ. 5A-5B показана противоопухолевая активность SG-559-xx ADC в мышинной модели BxPC3.

[0076] На ФИГ. 6A-6B показана противоопухолевая активность SG-559-01 LALA ADC в мышинной модели Karpas 299.

[0077] На ФИГ. 7 показана противоопухолевая активность SG-559-01 LALA ADC в мышинной модели Calu-1.

[0078] На ФИГ. 8A-8B показана противоопухолевая активность SG-559-01 LALA ADC в мышинной модели EBC-1.

[0079] На ФИГ. 9 показана блокирующая активность антитела SG-559-01 LALA и ADC in vitro в отношении PD-1/PD-L1.

[0080] На ФИГ. 10A-10D показана иммунотоксичность SG-559-01 и SG-559-01 LALA ADC в модели APC человека.

[0081] На ФИГ. 11A-11D показана иммунотоксичность SG-559-xx ADC в модели APC человека.

[0082] На ФИГ. 12A-12D показан иммунный ответ на стимуляцию LPS APC человека, обработанных SG-559-01 ADC, in vitro.

[0083] На ФИГ. 13А-13С показана инфильтрация внутриопухолевых иммунных клеток у мышей с опухолями Karpas 299, получавших SG-559-01 LALA vs-MMAE ADC.

[0084] На ФИГ. 14А-14F показан ответ внутриопухолевых воспалительных цитокинов у мышей с опухолями Karpas 299, получавших SG-559-01 LALA vs-MMAE ADC.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Определения

[0085] Для того чтобы настоящее описание можно было легче понять, сначала даны определения некоторых терминов. При использовании в настоящей заявке, если иное прямо не предусмотрено в настоящем документе, каждый из следующих терминов имеет значение, указанное ниже. Дополнительные определения изложены по всей заявке.

Термин «и/или», используемый в настоящем описании, следует понимать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе или без другого. Таким образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А и/или В» в настоящем описании, подразумевает включение «А и В», «А или В», «А» (индивидуально) и «В» (индивидуально). Аналогично, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (индивидуально); В (индивидуально); и С (индивидуально).

[0087] Понятно, что аспекты и варианты осуществления изобретения, описанные в настоящем документе, включают «включающие», «состоящие» и «по существу состоящие из» аспектов и вариантов осуществления.

[0088] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное раскрытие. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, предоставляют специалисту общий словарь множества терминов, используемых в настоящем описании.

[0089] Единицы, префиксы и символы обозначаются в форме, принятой Système International de Unites (SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Представленные в настоящем описании заголовки не являются ограничениями различных аспектов описания, которые могут быть получены путем ссылки на описание в целом. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, больше полно определены посредством ссылки на описание в целом.

[0090] Термины «PD-L1», «CD274», «B7-H1» и «лиганд 1 программируемой клеточной смерти» используются здесь взаимозаменяемо и, если не указано иное, включают любые варианты, изоформы и видовые гомологи PD-L1 человека, которые обычно экспрессируются клетками или экспрессируются на клетках, трансфицированных геном PD-L1.

[0091] Термин «иммуноглобулин» обозначает класс структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) низкомолекулярных цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, все четыре связаны между собой дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо охарактеризована. См., например, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Вкратце, каждая тяжелая цепь обычно состоит из вариабельной области тяжелой цепи (обозначаемой здесь VH или VH) и константной области тяжелой цепи (CH или CH). Константная область тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Тяжелые цепи обычно связаны между собой дисульфидными связями в так называемой «шарнирной области». Каждая легкая цепь обычно состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначаемой здесь как VL или VL) и константной области легкой цепи (CL или CL). Константная область легкой цепи обычно состоит из одного домена, CL. CL может относиться к изотипу κ (каппа) или λ (лямбда). Термины «константный домен» и «константная область» используются здесь взаимозаменяемо. Иммуноглобулин может происходить из любого широко известного изотипа, включая, но не ограничиваясь этим, IgA, секреторный IgA, IgG и IgM. Подклассы IgG также хорошо известны специалистам в данной области и включают, но не ограничиваются ими, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека. «Изотип» относится к классу или подклассу антител (например, IgM или IgG1), которые кодируются генами константной области тяжелой цепи.

[0092] Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или форме структурно определенных петель), также называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежаясь с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Термины «определяющие комплементарность области» и «CDR», синонимичные «гипервариабельным областям» или «HVR», известны в данной области и относятся к несмежным последовательностям аминокислот в вариабельных областях антител, которые придают антигенную специфичность и/или аффинность связывания. Как правило, имеется три CDR в каждой вариабельной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждой вариабельной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). В данной области техники известно, что «каркасные области» и «FR» относятся к частям, отличным от CDR, вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. Как правило, имеется четыре FR в каждой полноразмерной вариабельной области тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4) и четыре FR в каждой полноразмерной вариабельной области легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4). Внутри каждого VH и VL три CDR и четыре FR обычно располагаются от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1,

CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (см. также Chothia and Lesk J. *Mol. Biol.*, 195, 901-917 (1987)).

[0093] Термин «антитело» (Ab) в контексте настоящего изобретения относится к молекуле иммуноглобулина, фрагменту молекулы иммуноглобулина или производному любого из них, которое обладает способностью специфически связываться с антигеном в типичных физиологических условиях с периодом полужизни, составляющим значительные периоды времени, такие как по меньшей мере примерно 30 мин, по меньшей мере примерно 45 мин, по меньшей мере примерно один час (ч), по меньшей мере примерно два часа, по меньшей мере примерно четыре часа, по меньшей мере примерно восемь часов, по меньшей мере примерно 12 часов (ч), примерно 24 часов или больше, примерно 48 часов или больше, примерно три, четыре, пять, шесть, семь или больше дней и т. д. или любой другой соответствующий функционально определенный период (например, время, достаточное для индукции, стимуляции, усиления и/или модулирования физиологического ответа, связанного со связыванием антитела с антигеном, и/или время, достаточное для того, чтобы антитело начало проявлять эффекторную активность). Вариабельные области тяжелой и легкой цепей молекулы иммуноглобулина содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител (Ab) могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q, первый компонент в классический путь активации комплемента. Антитело также может быть биспецифическим антителом, диателом, мультиспецифическим антителом или подобной молекулой.

[0094] Термин «моноклональное антитело», используемый в настоящем описании, относится к препарату молекул антител, которые рекомбинантно продуцируются с одной первичной аминокислотной последовательности. Композиция моноклонального антитела демонстрирует уникальную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу. Соответственно, термин «человеческое моноклональное антитело» обозначает антитела, демонстрирующие уникальную специфичность связывания, и которые содержат вариабельные и константные области, выделенные из человеческих зародышевых последовательностей иммуноглобулинов. Моноклональные антитела человека могут быть получены с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную из трансгенного или трансхромосомного животного, отличного от человека, такого как трансгенная мышь, имеющая геном, содержащий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи, слитый с иммортализованной клеткой.

[0095] «Выделенное антитело» относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-L1, по существу не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от PD-L1). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-L1, может

иметь перекрестную реактивность с другими антигенами, такими как молекулы PD-L1 разных видов. Кроме того, выделенное антитело может по существу не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ. В одном варианте осуществления выделенное антитело включает конъюгат антитела, присоединенного к другому агенту (например, низкомолекулярному лекарственному средству). В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело против PD-L1 включает конъюгат антитела против PD-L1 с низкомолекулярным лекарственным средством (например, MMAE или MMAF).

[0096] «Человеческое антитело» (HuMAb) относится к антителу, имеющему переменные области, в которых как FR, так и CDR происходят из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, то константная область также происходит из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Однако термин «человеческое антитело», используемый в настоящем описании, не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были трансплантированы на человеческие каркасные последовательности. Термины «человеческие антитела» и «полностью человеческие антитела» используются как синонимы.

[0097] Термин «гуманизированное антитело», используемый в настоящем описании, относится к генетически сконструированному антителу, которое не является человеческим и которое содержит константные домены человеческого антитела и отличные от человеческих переменные домены, модифицированные таким образом, чтобы обеспечить высокий уровень гомологии последовательностей с человеческими переменными доменами. Этого можно достичь путем трансплантации шести определяющих комплементарность областей (CDR) антител, не являющихся человеческими, и которые вместе образуют антигенсвязывающий участок, на гомологичную человеческую акцепторную каркасную область (FR) (см. WO 92/22653 и EP0629240). Чтобы полностью восстановить аффинность связывания и специфичность исходного антитела, может потребоваться замена остатков каркаса исходного антитела (т. е. не являющегося человеческим антителом) человеческими каркасными областями (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может помочь идентифицировать аминокислотные остатки в каркасных областях, которые важны для связывающих свойств антитела. Таким образом, гуманизированное антитело может содержать последовательности CDR, не являющиеся человеческими, прежде всего, человеческие каркасные области, необязательно содержащие одну или больше обратных мутаций аминокислот в аминокислотной последовательности, не являющейся человеческой, и полностью человеческие константные области. Необязательно, для

получения гуманизированного антитела с предпочтительными характеристиками, такими как аффинность и биохимические свойства, могут быть применены дополнительные аминокислотные модификации, которые необязательно являются обратными мутациями.

[0098] Термин «химерное антитело», используемый в настоящем описании, относится к антителу, в котором переменная область получена из вида, отличного от человека (например, получена из грызунов), а константная область получена из другого вида, такого как человек. Химерные антитела могут быть получены с помощью конструирования антител. «Конструирование антител» является общим термином для различных видов модификаций антител, и этот процесс хорошо известен специалистам в данной области техники. В частности, химерное антитело может быть получено с использованием стандартных способов ДНК, как описано в Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, Ch. 15. Таким образом, химерное антитело может представлять собой рекомбинантное антитело, сконструированное генетически или ферментативно. Специалисту в данной области известно, как получить химерное антитело, и, таким образом, получение химерного антитела по настоящему изобретению может быть осуществлено способами, отличными от описанных в настоящем документе. Химерные моноклональные антитела для терапевтического применения разработаны для снижения иммуногенности антител. Как правило, они могут содержать переменные области, отличные от человеческих, (например, мышинные), которые являются специфическими в отношении интересующего антигена, и константные домены тяжелой и легкой цепей человеческого антитела. Термины «переменная область» или «переменные домены», используемые в контексте химерных антител, относятся к области, которая включает CDR и каркасные области как тяжелой, так и легкой цепей иммуноглобулина.

[0099] «Антитело против антигена» относится к антителу, которое связывается с антигеном. Например, антитело против PD-L1 представляет собой антитело, которое связывается с антигеном PD-L1.

[0100] «Антигенсвязывающая часть» или антигенсвязывающий фрагмент антитела относится к одному или больше фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном, связанным цельным антителом. Примеры фрагментов антител (например, антигенсвязывающего фрагмента) включают, но не ограничиваются ими, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv); и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Расщепление антител папаином дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых «Fab»-фрагментами, каждый с одним антигенсвязывающим сайтом, и остаточный «Fc»-фрагмент, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином дает фрагмент F(ab')₂, который имеет два антигенсвязывающих сайта и все еще способен к перекрестному связыванию антигена.

[0101] «Процент (%) идентичности последовательности» по отношению к

эталонной полипептидной последовательности определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если необходимо, для достижения максимальной процентной идентичности последовательности и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание в целях определения процентной идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, которые известны специалисту в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Например, % идентичности последовательности данной аминокислотной последовательности А относительно данной аминокислотной последовательности В, с данной аминокислотной последовательностью В или против нее (которую можно альтернативно обозначить как заданную аминокислотную последовательность А, которая имеет или содержит определенный % идентичности последовательности по отношению к данной аминокислотной последовательности В, с данной аминокислотной последовательностью В или против нее) рассчитывается следующим образом:

100 умножить на дробь X/Y ,

где X представляет собой количество аминокислотных остатков, которые считаются идентичными совпадениям последовательностей в этой программе выравнивания А и В, и где Y представляет собой общее количество аминокислотных остатков в В. Следует понимать, что если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, то % идентичности последовательности А с В не будет равен % идентичности последовательности В с А.

[0102] Используемые в настоящем описании термины «связывание», «связывает» или «специфически связывает» в контексте связывания антитела с заданным антигеном обычно представляют собой связывание с аффинностью, соответствующей K_D примерно 10^{-6} М или меньше, например 10^{-7} М или меньше, например, примерно 10^{-8} М или меньше, например, примерно 10^{-9} М или меньше, примерно 10^{-10} М или меньше, или примерно 10^{-11} М или даже меньше, при определении, например, с помощью технологии биослойной интерферометрии (BLI) в приборе Octet HTX с использованием антитела в качестве лиганда и антигена в качестве аналита, и где антитело связывается с заданным антигеном с аффинностью, соответствующей K_D , которая по меньшей мере в десять раз ниже, например, по меньшей мере в 100 раз ниже, например, по меньшей мере в 1000 раз ниже, например, по меньшей мере в 10000 раз ниже, например, по меньшей мере в 100000 раз ниже, чем его K_D связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA,

казеином), отличным от заданного антигена или близкородственного антигена. Количество, при котором K_D связывания ниже, зависит от K_D антитела, поэтому, когда K_D антитела очень низкая, тогда количество, при которой K_D связывания с антигеном ниже, чем K_D связывания с неспецифическим антигеном может быть по меньшей мере в 10000 раз больше (то есть антитело является высокоспецифичным).

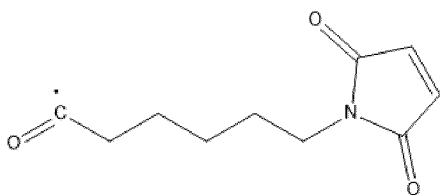
[0103] Термин « K_D » (M), используемый в настоящем описании, относится к константе равновесия диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Аффинность, используемая в настоящем описании, и K_D обратно пропорциональны, то есть более высокая аффинность предназначена для обозначения больше низкой K_D , а более низкая аффинность предназначена для обозначения более высокой K_D .

[0104] Термин «ADC» относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, который в контексте настоящего изобретения относится к антителу против PD-L1, которое связано с фрагментом лекарственного средства (например, MMAE или MMAF), как описано в настоящей заявке.

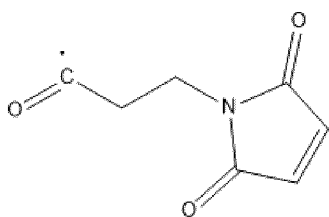
[0105] Аббревиатуры «vc» и «val-cit» относятся к дипептидному линкеру валин-цитруллин.

[0106] Аббревиатура VKG относится к трипептидному линкеру валин-лизин-глицин.

[0107] Аббревиатура «MC» относится к фрагменту малеимидапропиола:



[0108] Аббревиатура «MP» относится к малеимидопропиону:



[0109] «Единица ПЭГ», используемая в настоящем описании, представляет собой органическую группу, состоящую из повторяющихся этиленокси-субъединиц (ПЭГ или ПЭГ-субъединиц), и может быть полидисперсной, монодисперсной или дискретной (т. е. иметь дискретное количество этилен-окси-субъединиц). Полидисперсные ПЭГ представляют собой гетерогенную смесь размеров и молекулярных масс, тогда как монодисперсные ПЭГ обычно очищают от гетерогенных смесей и, следовательно, обеспечивают одинаковую длину цепи и молекулярную массу. Предпочтительные единицы ПЭГ включают дискретные ПЭГ, соединения, которые синтезируются поэтапно,

а не посредством процесса полимеризации. Дискретные ПЭГ представляют собой единую молекулу с определенной и конкретной длиной цепи.

[0110] Единица ПЭГ по настоящему изобретению содержит одну или больше цепей полиэтиленгликоля, каждая из которых состоит из одной или больше этиленокси-субъединиц, ковалентно связанных друг с другом. Цепи полиэтиленгликоля могут быть связаны друг с другом, например, в виде линейной, разветвленной или звездообразной конфигурации. Как правило, по меньшей мере одна из цепей полиэтиленгликоля перед включением в конъюгат камптотецина подвергается модификации на одном конце алкильным фрагментом, замещенным электрофильной группой для ковалентного присоединения к карбаматному азоту метиленкарбаматной единицы (т. е. представляет собой пример Р). Как правило, концевая этиленокси-субъединица в каждой цепи полиэтиленгликоля, не участвующая в ковалентном присоединении к остальной части линкерной единицы, модифицируется блокирующим звеном ПЭГ, обычно необязательно замещенным алкилом, таким как $-\text{CH}_3$, CH_2CH_3 или $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$. Предпочтительное единица ПЭГ имеет единую цепь полиэтиленгликоля с 2-24 субъединицами $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, ковалентно соединенными последовательно и заканчивающимися на одном конце кэпирующей единицей ПЭГ.

[0111] «Онкологическое заболевание» относится к широкой группе различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. «Рак» или «раковая ткань» может включать опухоль. Нерегулируемое деление и рост клеток приводит к образованию злокачественных опухолей, которые проникают в соседние ткани, а также могут метастазировать в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровотоки. Можно сказать, что после метастазирования дистальные опухоли «происходят от» преметастазной опухоли.

[0112] Термин «антителозависимая клеточная цитотоксичность» или ADCC представляет собой механизм индукции клеточной смерти, который зависит от взаимодействия покрытых антителами клеток-мишеней с иммунными клетками, обладающими литической активностью (также называемыми эффекторными клетками). Такие эффекторные клетки включают клетки-натуральные киллеры, моноциты/макрофаги и нейтрофилы. Эффекторные клетки прикрепляются к эффекторным доменам Fc Ig , связанным с клетками-мишенями через их антигенсвязывающие сайты. Смерть клетки-мишени, покрытой антителами, происходит в результате активности эффекторных клеток.

[0113] Термин «антителозависимый клеточный фагоцитоз» или ADCP относится к процессу, при котором клетки, покрытые антителами, полностью или частично интернализуются фагоцитирующими иммунными клетками (например, макрофагами, нейтрофилами и дендритными клетками), которые связываются с эффекторным доменом(ами) Fc Ig .

[0114] Термин «комплементзависимая цитотоксичность» или CDC относится к механизму индукции клеточной смерти, при котором эффекторный Fc -домен антитела, связанного с мишенью, активирует ряд ферментативных реакций, завершающихся

образованием впадин в мембране клетки-мишени. Как правило, комплексы антиген-антитело, такие как комплексы на покрытых антителами клетках-мишенях, связываются и активируют компонент комплемента C1q, который, в свою очередь, активирует каскад комплемента, ведущий к гибели клетки-мишени. Активация комплемента может также приводить к депонированию компонентов комплемента на поверхности клетки-мишени, что способствует ADCC путем связывания рецепторов комплемента (например, CR3) на лейкоцитах.

[0115] «Цитостатический эффект» относится к ингибированию пролиферации клеток. «Цитостатический агент» относится к агенту, который оказывает цитостатическое действие на клетку, тем самым ингибируя рост и/или размножение определенного подмножества клеток. Цитостатические агенты можно конъюгировать с антителом или вводить в комбинации с антителом.

[0116] «Лечение» или «терапия» пациента относится к любому типу вмешательства или к процессу, осуществляемому в отношении пациента, или к введению активного агента пациенту с целью обратить вспять, облегчить, улучшить, ингибировать, замедлить или предотвратить начало, прогрессирование, развитие, тяжесть или рецидив симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой онкологическое заболевание.

[0117] «Пациент» включает любого человека или животное, отличное от человека. Термин «животное, отличное от человека» включает, но не ограничивается ими, позвоночных, таких как приматы, отличные от человека, овцы, собаки и грызуны, такие как мыши, крысы и морские свинки. В некоторых вариантах осуществления пациентом является человек. Термины «объект», «пациент» и «индивидуум» используются здесь взаимозаменяемо.

[0118] «Эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» лекарственного средства или терапевтического средства представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при применении индивидуально или в комбинации с другим терапевтическим средством защищает пациента от возникновения заболевания или способствует регрессу заболевания, о чем свидетельствует уменьшение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или предотвращение ухудшения состояния или инвалидности из-за болезни. Способность терапевтического средства способствовать регрессу заболевания можно оценить с помощью различных методов, известных квалифицированному практикующему врачу, например, у человека во время клинических испытаний, на животных модельных системах, предсказывающих эффективность у человека, или путем анализа активности терапевтического агента в анализах *in vitro*.

[0119] Например, для лечения опухолей терапевтически эффективное количество противоопухолевого агента ингибирует рост клеток или рост опухоли по меньшей мере

примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70% или по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98% или по меньшей мере примерно на 99% у пациента (пациентов), получающих лечение (например, у одного или больше пациентов, получающих лечение) по сравнению с пациентом (пациентами, не получающими лечения) (например, один или больше пациентов, не получающих лечение). В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество противоопухолевого агента ингибирует рост клеток или рост опухоли на 100% у пациента(ов), получающего лечение (например, у одного или больше пациентов, получающих лечение), по сравнению с пациентом(ами), не получающим лечения (например, одного или больше пациентов, не получающих лечение).

[0120] В других вариантах осуществления изобретения регрессия опухоли может наблюдаться и продолжаться в течение по меньшей мере примерно 20 дней, по меньшей мере примерно 30 дней, по меньшей мере примерно 40 дней, по меньшей мере примерно 50 дней или по меньшей мере примерно 60 дней.

[0121] Терапевтически эффективное количество лекарственного средства (например, конъюгата антитела против PD-L1-лекарственное средство) включает «профилактически эффективное количество», которое представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при введении индивидуально или в комбинации с противоопухолевым средством пациенту с риском развития онкологического заболевания (например, пациент, имеющий предраковое состояние) или страдающий рецидивом рака, ингибирует развитие или рецидив рака. В некоторых вариантах осуществления профилактически эффективное количество полностью предотвращает развитие или рецидив онкологического заболевания. «Подавление» развития или рецидива онкологического заболевания означает либо уменьшение вероятности развития или рецидива онкологического заболевания, либо полное предотвращение развития или рецидива онкологического заболевания.

[0122] Используемый в настоящем описании термин «субтерапевтическая доза» означает дозу терапевтического соединения (например, конъюгата антитела против PD-L1- лекарственное средство), которая ниже обычной или типичной дозы терапевтического соединения при введении индивидуально для лечения гиперпролиферативного заболевания (например, онкологического заболевания).

[0123] «Иммуннозависимый ответ» относится к клиническому ответу, часто наблюдаемому у онкопациентов, получающих лечение иммунотерапевтическими агентами, которые оказывают противоопухолевое действие, индуцируя опухолеспецифические иммунные ответы или модифицируя нативные иммунные процессы. Этот тип ответа характеризуется благоприятным терапевтическим эффектом,

который следует за начальным увеличением опухолевой массы или появлением новых поражений, которые при оценке традиционных химиотерапевтических средств классифицируются как прогрессирование заболевания и являются синонимом неэффективности лекарств. Соответственно, правильная оценка иммунотерапевтических агентов может потребовать долгосрочного мониторинга эффектов этих агентов на заболевание-мишень.

[0124] Например, «противоопухолевый агент» способствует регрессии рака у пациента. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество лекарственного средства способствует регрессии рака вплоть до полного устранения рака. «Стимулирование регрессии рака» означает, что введение эффективного количества лекарственного средства отдельно или в комбинации с противоопухолевым агентом приводит к уменьшению роста или размера опухоли, некрозу опухоли, снижению тяжести по меньшей мере одного симптома заболевания, увеличению частоты и продолжительности бессимптомных периодов болезни или предотвращению ухудшения или инвалидности из-за болезни. Кроме того, термины «эффективный» и «эффективность» в отношении лечения включают как фармакологическую эффективность, так и физиологическую безопасность. Фармакологическая эффективность относится к способности препарата стимулировать регрессию рака у пациента. Физиологическая безопасность относится к уровню токсичности или другим неблагоприятным физиологическим эффектам на уровне клеток, органов и/или организма (неблагоприятные эффекты), возникающим в результате введения лекарственного средства.

[0125] «Устойчивый ответ» относится к устойчивому эффекту снижения роста опухоли после прекращения лечения. Например, размер опухоли может оставаться таким же или меньшим по сравнению с размером в начале фазы введения. В некоторых вариантах осуществления устойчивый ответ имеет продолжительность, по меньшей мере такую же, как продолжительность лечения, или по меньшей мере в 1,5, 2, 2,5 или 3 раза больше, чем продолжительность лечения.

[0126] Используемый в настоящем описании термин «полный ответ» или «CR» относится к исчезновению всех поражений-мишеней; «частичный ответ» или «PR» относится к уменьшению по меньшей мере на 30% суммы самых длинных диаметров (SLD) поражений-мишеней, принимая в качестве эталона исходный SLD; и «стабильное заболевание» или «SD» не относится ни к достаточному уменьшению поражений-мишеней, чтобы квалифицировать их как PR, ни к достаточному увеличению, чтобы квалифицировать как PD, принимая в качестве эталона наименьшее SLD с момента начала лечения.

[0127] Используемый в настоящем описании термин «выживаемость без прогрессирования» или «PFS» относится к продолжительности времени во время и после лечения, в течение которого состояние при заболевании, которое подвергается лечению (например, рак), не ухудшается. Выживаемость без прогрессирования может включать

количество времени, в течение которого у пациентов наблюдался полный или частичный ответ, а также количество времени, в течение которого у пациентов наблюдалась стабилизация заболевания.

[0128] Используемый в настоящем описании термин «общая частота ответа» или «ORR» относится к сумме частоты полного ответа (CR) и частоты частичного ответа (PR).

[0129] Используемый в настоящем описании термин «общая выживаемость» или «OS» относится к проценту лиц в группе, которые, вероятно, будут живы после определенного периода времени.

[0130] Фраза «фармацевтически приемлемый» указывает на то, что вещество или композиция должны быть совместимы химически и/или токсикологически с другими ингредиентами, входящими в состав, и/или с млекопитающим, которое подвергают лечению.

[0131] Фраза «фармацевтически приемлемая соль», используемая в настоящем описании, относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям соединения по изобретению. Примеры солей включают, но не ограничиваются ими, сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, йодид, нитрат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, fumarat, глюконат, глюкуронат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, метансульфонат «мезилат», этансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат, памоат (т. е. 4,4'-метилден-бис-(2-гидрокси-3-нафтаат)) соли, соли щелочных металлов (например, натрия и калия), соли щелочноземельных металлов (например, магния) и соли аммония. Фармацевтически приемлемая соль может включать включение другой молекулы, такой как ацетат-ион, сукцинат-ион или другой противоион. Противоион может быть любым органическим или неорганическим фрагментом, который стабилизирует заряд исходного соединения. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь в своей структуре больше одного заряженного атома. Случаи, когда несколько заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, могут иметь несколько противоионов. Следовательно, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или больше заряженных атомов и/или один или несколько противоионов.

[0132] «Введение» относится к физическому введению терапевтического агента пациенту с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области. Типичные способы введения конъюгата антитела против PD-L1-лекарственное средство включают внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии (например, внутривенной инфузии). Фраза «парентеральное введение», используемая в настоящем описании, означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включает, без ограничения, внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, интратекальное, внутрилимфатическое, внутриочаговое, внутрикапсульное, интраорбитальное,

внутрисердечное, внутрикожное, внутрибрюшинное, транстрахеальное, подкожное, субкутикулярное, внутрисуставное, субкапсулярное, субарахноидальное, внутриспинальное, эпидуральное и интратеральное введение и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. Терапевтическое средство можно вводить непарентеральным путем или перорально. Другие непарентеральные пути включают местный, эпидермальный или слизистый путь введения, например, интраназально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также можно осуществлять, например, один раз, множество раз и/или в течение одного или больше продолжительных периодов времени.

[0133] Термины «исходный уровень» или «исходное значение», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, могут относиться к измерению или характеристике симптома перед введением терапии (например, конъюгата антител против PD-L1-лекарственное средство, как описано в настоящем документе) или в начале введения терапии. Исходное значение можно сравнить с эталонным значением, чтобы определить уменьшение или улучшение симптома PD-L1-ассоциированного заболевания, рассматриваемого в настоящем документе (например, рака). Термины «эталон» или «референсное значение», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, могут относиться к измерению или характеристике симптома после введения терапии (например, конъюгата антител против PD-L1-лекарственное средство, как описано). Эталонное значение может быть измерено один или больше раз в течение режима дозирования или цикла лечения или по завершении режима дозирования или цикла лечения. «Эталонное значение» может представлять собой абсолютное значение; относительное значение; значение, которое имеет верхний и/или нижний предел; диапазон значений; среднее значение; медианное значение; среднее значение; или значение по сравнению с исходным значением.

[0134] Точно так же «исходное значение» может представлять собой абсолютное значение; относительное значение; значение, которое имеет верхний и/или нижний предел; диапазон значений; среднее значение; медианное значение; среднее значение; или значение по сравнению с эталонным значением. Эталонное значение и/или исходное значение можно получить от одного человека, от двух разных людей или от группы людей (например, группы из двух, трех, четырех, пяти или больше человек).

[0135] Используемый в настоящем описании термин «монотерапия» означает, что конъюгат антител против PD-L1-лекарственное средство является единственным противоопухолевым агентом, вводимым пациенту в течение цикла лечения. Однако пациенту можно вводить другие терапевтические агенты. Например, противовоспалительные агенты или другие агенты, вводимые онкопациенту для лечения симптомов, ассоциированных с раком, но не самого основного рака, включая, например, воспаление, боль, потерю веса и общее недомогание, можно вводить во время периода монотерапии.

[0136] «Нежелательное явление» (НЯ), как используется в настоящем описании,

представляет собой любой неблагоприятный и, как правило, непреднамеренный или нежелательный признак (включая аномальные лабораторные данные), симптом или заболевание, ассоциированное с использованием медицинского лечения. Медикаментозное лечение может иметь одно или больше ассоциированных НЯ, и каждое НЯ может иметь одинаковую или разную степень тяжести. Ссылка на методы, способные «изменять нежелательные явления», означает схему лечения, которая снижает частоту и/или тяжесть одного или больше НЯ, ассоциированных с применением другой схемы лечения.

[0137] «Серьезное нежелательное явление» или «СНЯ», используемое в настоящем описании, представляет собой нежелательное явление, которое соответствует одному из следующих критериев:

Является смертельным или опасным для жизни (как используется в определении серьезного нежелательного явления, «угрожающее жизни» относится к событию, при котором пациент находился в опасности смерти во время события; это не относится к событию, которое гипотетически могло бы вызвать смерть, если бы оно было более серьезным.

Приводит к стойкой или значительной инвалидности/нетрудоспособности.

Представляет собой врожденную аномалию/врожденный дефект.

Является значимым с медицинской точки зрения, т. е. определяется как событие, которое подвергает опасности пациента или может потребовать медицинского или хирургического вмешательства для предотвращения одного из перечисленных выше исходов. При принятии решения о том, является ли НЯ «медицински значимым», необходимо исходить из медицинских и научных суждений.

Требуется стационарная госпитализация или продление имеющейся госпитализации, за исключением следующего: 1) плановое лечение или наблюдение за основным заболеванием, не ассоциированным с каким-либо ухудшением состояния; 2) выборочное или заранее запланированное лечение ранее существовавшего состояния, не ассоциированного с исследуемым показанием и не ухудшившегося с момента подписания информированного согласия; 3) социальные причины и временный уход при отсутствии ухудшения общего состояния пациента.

[0138] Использование альтернативы (например, «или») следует понимать как означающее либо одну, обе или любую комбинацию альтернатив. Используемый в настоящем описании термин «один» следует понимать как относящийся к «одному или больше» любого приведенного или перечисленного компонента.

[0139] Термины «примерно» или «по существу состоящий из» относятся к значению или составу, которые находятся в допустимом диапазоне ошибок для конкретного значения или состава, как это определено специалистом в данной области, что будет частично зависеть от того, как значение или состав измеряется или определяется, т. е. от ограничения системы измерения. Например, «примерно» или «по существу состоящий из» может означать в пределах 1 или больше 1 стандартного

отклонения в соответствии с практикой в данной области техники. В качестве альтернативы, «примерно» или «по существу состоящий из» может означать диапазон до 20%. Кроме того, особенно в отношении биологических систем или процессов, эти термины могут означать до порядка величины или до 5-кратного значения. Если в заявке и формуле изобретения указаны конкретные значения или составы, если не указано иное, следует предполагать, что значение «примерно» или «по существу состоящий из» находится в допустимом диапазоне ошибок для этого конкретного значения или состава.

[0140] Ссылка на «примерное» значение или параметр в настоящей заявке включает (и описывает) варианты осуществления, которые относятся, по существу, к значению или параметру. Например, описание, относящееся к «примерно X», охватывает и описывает «X».

[0141] Как описано в настоящем документе, любой диапазон концентраций, процентный диапазон, диапазон отношений или диапазон целых чисел следует понимать как включающий значение любого целого числа в пределах указанного диапазона и, при необходимости, его доли (например, одну десятую и одну сотую целого числа), если не указано другое.

[0142] Различные аспекты раскрытия описаны больше подробно в следующих подразделах.

II. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ:

[0143] Изобретение относится к антителам и ADC, которые специфически связываются с PD-L1. Настоящее изобретение частично основано на открытии того, что конъюгаты антитело-лекарственное средство, включающие конъюгаты MMAE антитело-лекарственное средство и конъюгаты с камптотецином антитело-лекарственное средство, нацеленные на PD-L1, особенно эффективны для уничтожения PD-L1⁺ экспрессирующих клеток. Было показано, что PD-L1 экспрессируется при различных видах рака, включая меланому, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), мелкоклеточный рак легкого (SCLC), рак головы и шеи, тройной негативный рак молочной железы (TNBC), рак яичников, уротелиальный рак, гепатоцеллюлярная карцинома (HCC), рак желудка и рак шейки матки.

III. Целевые молекулы

[0144] Если не указано иное, PD-L1 относится к PD-L1 человека. Иллюстративной последовательности белка человека присвоен номер UniProt ID NO. Q9NZQ7.

IV. Антитела по изобретению

[0145] Ранее некоторые антитела, уже используемые для лечения онкологического заболевания, были конъюгированы без модификации последовательности с цитотоксическими агентами для получения конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC). Эти ADC часто оказываются эффективными или даже больше эффективными, чем неконъюгированные антитела, при уничтожении опухолевых клеток. Ранее, если в процессе получения ADC предполагались модификации антитела, некоторые возможные модификации заключались в повышении аффинности связывания антитела или усилении

действия антитела, такого как ADCC. Однако было обнаружено, что, по меньшей мере, в некоторых ситуациях модификация или настройка ADC-антитела, например, за счет снижения его аффинности связывания или уменьшения его ADCC-активности, приводит к повышению эффективности ADC по сравнению с ADC с немодифицированным антителом. Некоторые примеры этого включают ADC с антителами против PD-L1 (такими как Ab1), которые неожиданно оптимизированы путем модификации антител, например, путем снижения их аффинности связывания. Например, в некоторых случаях ADC антитела против PD-L1 больше эффективно уничтожает опухолевые клетки *in vitro*, когда аффинность связывания антитела, конъюгированного с цитотоксическим агентом, снижена. В другом примере, в некоторых случаях ADC антитела против PD-L1 больше эффективен для уничтожения опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*, когда аффинность связывания антитела, конъюгированного с цитотоксическим агентом, снижена.

[0146] В изобретении предложены антитела, такие как гуманизированные антитела, которые связываются с PD-L1 с аффинностью связывания от 3 нМ до 300 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, могут связываться с PD-L1 с K_D в диапазоне примерно 3 нМ - 300 нМ (например, примерно от 3 нМ примерно до 275 нМ, примерно от 3 нМ примерно до 250 нМ, примерно от 3 нМ примерно до 225 нМ, примерно от 3 нМ примерно до 200 нМ, примерно от 3 нМ примерно до 175 нМ, примерно от 3 нМ примерно до 150 нМ, примерно от 3 нМ примерно до 125 нМ, примерно от 3 нМ примерно до 100 нМ, примерно от 3 нМ примерно до 90 нМ, примерно от 3 нМ примерно до 80 нМ, примерно от 3 нМ примерно до 70 нМ, примерно от 3 нМ примерно до 60 нМ, примерно от 3 нМ примерно до 50 нМ, примерно от 3 нМ примерно до 40 нМ, примерно от 3 нМ примерно до 30 нМ, примерно от 3 нМ примерно до 20 нМ, примерно от 3 нМ примерно до 10 нМ, примерно от 10 нМ примерно до 300 нМ, примерно от 10 нМ примерно до 275 нМ, примерно от 10 нМ примерно до 250 нМ, примерно от 10 нМ примерно до 225 нМ, примерно от 10 нМ примерно до 200 нМ, примерно от 10 нМ примерно до 175 нМ, примерно от 10 нМ примерно до 150 нМ, примерно от 10 нМ примерно до 125 нМ, примерно от 10 нМ примерно до 100 нМ, примерно от 10 нМ примерно до 90 нМ, примерно от 10 нМ примерно до 80 нМ, примерно от 10 нМ примерно до 70 нМ, примерно от 10 нМ примерно до 60 нМ, примерно от 10 нМ примерно до 50 нМ, примерно от 10 нМ примерно до 40 нМ, примерно от 10 нМ примерно до 30 нМ, примерно от 10 нМ примерно до 20 нМ, примерно от 20 нМ примерно до 300 нМ, примерно от 20 нМ примерно до 275 нМ, примерно от 20 нМ примерно до 250 нМ, примерно от 20 нМ примерно до 225 нМ, примерно от 20 нМ примерно до 200 нМ, примерно от 20 нМ примерно до 175 нМ, примерно от 20 нМ примерно до 150 нМ, примерно от 20 нМ примерно до 125 нМ, примерно от 20 нМ примерно до 100 нМ, примерно от 20 нМ примерно до 90 нМ, примерно от 20 нМ примерно до 80 нМ, примерно от 20 нМ примерно до 70 нМ, примерно от 20 нМ примерно до 60 нМ, примерно от 20 нМ примерно до 50 нМ, примерно от 20 нМ примерно до 40 нМ, примерно от 20 нМ).

[illegible]

примерно до 200 нМ, примерно от 90 нМ примерно до 175 нМ, примерно от 90 нМ
 примерно до 150 нМ, примерно от 90 нМ примерно до 125 нМ, примерно от 90 нМ
 примерно до 100 нМ, примерно от 100 нМ примерно до 300 нМ, примерно от 100 нМ
 примерно до 275 нМ, примерно от 100 нМ примерно до 250 нМ, примерно от 100 нМ
 примерно до 225 нМ, примерно от 100 нМ примерно до 200 нМ, примерно от 100 нМ
 примерно до 175 нМ, примерно от 100 нМ примерно до 150 нМ, примерно от 100 нМ
 примерно до 125 нМ, примерно от 125 нМ примерно до 300 нМ, примерно от 125 нМ
 примерно до 275 нМ, примерно от 125 нМ примерно до 250 нМ, примерно от 125 нМ
 примерно до 225 нМ, примерно от 125 нМ примерно до 200 нМ, примерно от 125 нМ
 примерно до 175 нМ, примерно от 125 нМ примерно до 150 нМ, примерно от 150 нМ
 примерно до 300 нМ, примерно от 150 нМ примерно до 275 нМ, примерно от 150 нМ
 примерно до 250 нМ, примерно от 150 нМ примерно до 225 нМ, примерно от 150 нМ
 примерно до 200 нМ, примерно от 150 нМ примерно до 175 нМ, примерно от 175 нМ
 примерно до 300 нМ, примерно от 175 нМ примерно до 275 нМ, примерно от 175 нМ
 примерно до 250 нМ, примерно от 175 нМ примерно до 225 нМ, примерно от 175 нМ
 примерно до 200 нМ, примерно от 200 нМ примерно до 300 нМ, примерно от 200 нМ
 примерно до 275 нМ, примерно от 200 нМ примерно до 250 нМ, примерно от 200 нМ
 примерно до 225 нМ, примерно от 225 нМ примерно до 300 нМ, примерно от 225 нМ
 примерно до 275 нМ, примерно от 225 нМ примерно до 250 нМ, примерно от 250 нМ
 примерно до 300 нМ, примерно от 250 нМ примерно до 275 нМ, или примерно от 275 нМ
 примерно до 30 нМ) (например, как измерено с помощью биослойной интерферометрии
 (BLI) в фосфатно-буферном солевом растворе).

[0147] В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания представляет собой аффинность моновалентного связывания. В некоторых вариантах осуществления эти антитела представляют собой точечные мутанты полностью человеческого антитела Ab1 против PD-L1. Ab1 определяется областями CDR SEQ ID NO: 3-5 и SEQ ID NO: 6-8, вариабельными областями SEQ ID NO: 1 и 2 и тяжелой и легкой цепями SEQ ID NO: 86 и 87. В дополнительных вариантах осуществления точечные мутации находятся в областях CDR. В некоторых вариантах осуществления точечные мутанты демонстрируют пониженную аффинность связывания и/или повышенную цитотоксичность, и/или скорость интернализации по сравнению с Ab1. В некоторых вариантах осуществления точечные мутанты демонстрируют пониженную аффинность связывания и повышенную цитотоксичность *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления точечные мутанты демонстрируют пониженную аффинность связывания и повышенную цитотоксичность *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления точечные мутанты демонстрируют пониженную аффинность связывания и повышенную цитотоксичность как *in vitro*, так и *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления точечные мутанты демонстрируют пониженную аффинность связывания и повышенную скорость интернализации *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления точечные мутанты демонстрируют пониженную аффинность связывания и повышенную скорость

интернализации *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления точечные мутанты демонстрируют пониженную аффинность связывания и повышенную скорость интернализации как *in vitro*, так и *in vivo*.

[0148] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-L1, представленное в настоящем описании, может иметь всего одну или две аминокислотные замены в наборе из шести CDR тяжелой цепи SEQ ID NO. 3-5, и CDR легкой цепи SEQ ID NO. 6-8, и связывается с PD-L1 с K_D от 3 нМ до 300 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-L1, представленное в настоящем документе, может иметь одну аминокислотную замену в наборе из шести CDR тяжелой цепи SEQ ID NO. 3-5, и CDR легкой цепи SEQ ID NO. 6-8, и связывается с PD-L1 с K_D от 3 нМ до 300 нМ.

[0149] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-L1, представленное в настоящем документе, может иметь CDR1 тяжелой цепи, имеющую одну аминокислотную замену в SEQ ID NO: 3, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 4, CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 5, CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 6, CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 7 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 8, и связывается с PD-L1 с K_D от 3 нМ до 300 нМ. В некоторых вариантах осуществления одна аминокислотная замена в SEQ ID NO: 3 находится в аминокислотном положении 2 SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления одна аминокислотная замена в положении аминокислоты 2 SEQ ID NO: 3 представляет собой аминокислотную замену тирозина на аланин. В некоторых вариантах осуществления замена одной аминокислоты в положении аминокислоты 2 SEQ ID NO: 3 представляет собой аминокислотную замену тирозина на серин. В некоторых вариантах осуществления одна аминокислотная замена в положении аминокислоты 2 SEQ ID NO: 3 представляет собой аминокислотную замену тирозина на глицин. В некоторых вариантах осуществления одна аминокислотная замена в положении аминокислоты 2 SEQ ID NO: 3 представляет собой аминокислотную замену тирозина на треонин. В некоторых вариантах осуществления одна аминокислотная замена в положении аминокислоты 2 SEQ ID NO: 3 представляет собой аминокислотную замену тирозина на валин. В некоторых вариантах осуществления одна аминокислотная замена в положении аминокислоты 2 SEQ ID NO: 3 представляет собой аминокислотную замену тирозина на цистеин.

[0150] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-L1, представленное в настоящем документе, связывается как с гликозилированным, так и с негликозилированным PD-L1 с K_D от 3 нМ до 300 нМ (или в любом поддиапазоне этого диапазона, описанного в настоящем документе).

[0151] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-L1, представленное в настоящем описании, увеличило *in vitro* и/или *in vivo* цитотоксичность PD-L1⁺ клеток по сравнению с Ab1 (например, увеличение по меньшей мере на 5%, увеличение по меньшей мере на 10%, увеличение по меньшей мере на 20%, увеличение по меньшей мере на 30%, увеличение по меньшей мере на 40%, увеличение по меньшей мере на 50%, увеличение по меньшей мере на 60%, увеличение по меньшей мере на 70%, увеличение по меньшей мере на 80%, увеличение по меньшей мере на 90%, увеличение по

[illegible]

увеличение от 140% до 180%, увеличение от 140% до 160%, увеличение от 160% до 300%, увеличение от 160% до 280%, увеличение от 160% до 260%, увеличение от 160% до 240%, увеличение от 160% до 220%, увеличение от 160% до 200%, увеличение от 160% до 180%, увеличение от 180% до 300%, увеличение от 180% до 280%, увеличение от 180% до 260%, увеличение от 180% до 240%, увеличение от 180% до 220%, увеличение от 180% до 200%, увеличение от 200% до 300%, увеличение от 200% до 280%, увеличение от 200% до 260%, увеличение от 200% до 240%, увеличение от 200% до 220%, увеличение от 220% до 300%, увеличение от 220% до 280%, увеличение от 220% до 260%, увеличение от 220% до 240%, увеличение от 240% до 300%, увеличение от 240% до 280%, увеличение от 240% до 260%, увеличение от 260% до 300%, увеличение от 260% до 280%, или увеличение от 280% до 300%).

[0152] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-L1, представленное в настоящем документе, увеличило степень клеточной интернализации PD-L1+клетками по сравнению с Ab1 (например, увеличение по меньшей мере на 5%, увеличение по меньшей мере на 10%, увеличение по меньшей мере на 20%, увеличение по меньшей мере на 30%, увеличение по меньшей мере на 40%, увеличение по меньшей мере на 50%, увеличение по меньшей мере на 60%, увеличение по меньшей мере на 70%, увеличение по меньшей мере на 80%, увеличение по меньшей мере на 90%, увеличение по меньшей мере на 100%, увеличение по меньшей мере на 120%, увеличение по меньшей мере на 140%, увеличение по меньшей мере на 160%, увеличение по меньшей мере на 180%, увеличение по меньшей мере на 200%, увеличение по меньшей мере на 220%, увеличение по меньшей мере на 240%, увеличение по меньшей мере на 260%, увеличение по меньшей мере на 280%, увеличение по меньшей мере на 300% или увеличение в диапазоне от 5% до 300% (или в любом из поддиапазонов этого диапазона, описанного в настоящем документе)).

[0153] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-L1, представленное в настоящем документе, увеличило инфильтрацию иммунных клеток при введении млекопитающему по сравнению с Ab1 (например, увеличение по меньшей мере на 5%, увеличение по меньшей мере на 10%, увеличение по меньшей мере на 20%, увеличение по меньшей мере на 30%, увеличение по меньшей мере на 40%, увеличение по меньшей мере на 50%, увеличение по меньшей мере на 60%, увеличение по меньшей мере на 70%, увеличение по меньшей мере на 80%, увеличение по меньшей мере на 90%, увеличение по меньшей мере на 100%, увеличение по меньшей мере на 120%, увеличение по меньшей мере на 140%, увеличение по меньшей мере на 160%, увеличение по меньшей мере на 180%, увеличение по меньшей мере на 200%, увеличение по меньшей мере на 220%, увеличение по меньшей мере на 240%, увеличение по меньшей мере на 260%, увеличение по меньшей мере на 280%, увеличение по меньшей мере на 300% или увеличение в диапазоне от 5% до 300% (или в любом из поддиапазонов этого диапазона, описанного в настоящем документе)).

[0154] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против PD-L1,

представленное в настоящем документе, увеличило продукцию воспалительных цитокинов (например, одного или больше из любых описанных в настоящем документе цитокинов) при введении млекопитающему по сравнению с Ab1 (например, увеличение по меньшей мере на 5%, увеличение по меньшей мере на 10%, увеличение по меньшей мере на 20%, увеличение по меньшей мере на 30%, увеличение по меньшей мере на 40%, увеличение по меньшей мере на 50%, увеличение по меньшей мере на 60%, увеличение по меньшей мере на 70%, увеличение по меньшей мере на 80%, увеличение по меньшей мере на 90%, увеличение по меньшей мере на 100%, увеличение по меньшей мере на 120%, увеличение по меньшей мере на 140%, увеличение по меньшей мере на 160%, увеличение по меньшей мере на 180%, увеличение по меньшей мере на 200%, увеличение по меньшей мере на 220%, увеличение по меньшей мере на 240%, увеличение по меньшей мере на 260% , увеличение по меньшей мере на 280%, увеличение по меньшей мере на 300% или увеличение в диапазоне от 5% до 300% (или в любом из поддиапазонов этого диапазона, описанного в настоящем документе)).

[0155] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против PD-L1, представленное в настоящем документе, увеличило внутриклеточный гидролиз PD-L1+ клетками по сравнению с Ab1 (например, увеличение по меньшей мере на 5%, увеличение по меньшей мере на 10%, увеличение по меньшей мере на 20%, увеличение по меньшей мере на 30%, увеличение по меньшей мере на 40%, увеличение по меньшей мере на 50%, увеличение по меньшей мере на 60%, увеличение по меньшей мере на 70%, увеличение по меньшей мере на 80%, увеличение по меньшей мере на 90%, увеличение по меньшей мере на 100%, увеличение по меньшей мере на 120%, увеличение по меньшей мере на 140%, увеличение по меньшей мере на 160%, увеличение по меньшей мере на 180%, увеличение по меньшей мере на 200%, увеличение по меньшей мере на 220%, увеличение по меньшей мере на 240%, увеличение по меньшей мере на 260% , увеличение по меньшей мере на 280%, увеличение по меньшей мере на 300% или увеличение в диапазоне от 5% до 300% (или в любом из поддиапазонов этого диапазона, описанного в настоящем документе)).

[0156] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-L1, представленное в настоящем документе, изменило меньше чем на 10% количество нейтрофилов и/или тромбоцитов при введении млекопитающему по сравнению с Ab1 (например, изменение меньше чем 8%, изменение меньше чем 6%, изменение меньше чем 4%, изменение меньше чем 2%, или изменение меньше чем 1%).

[0157] Аффинность связывания антител против PD-L1 по изобретению (т. е. константа диссоциации, K_D) предпочтительно выше, чем у Ab1. Предпочтительные антитела против PD-L1 связываются с одним и тем же эпитопом и/или конкурируют с Ab1 за связывание с PD-L1 человека. В одном варианте осуществления аффинность связывания антител против PD-L1 по изобретению составляет больше чем 2,7 нМ. В другом варианте осуществления моновалентная аффинность связывания антител против PD-L1 по изобретению составляет больше чем 2,7 нМ. В другом варианте осуществления k_{assoc} (или скорость ассоциации) меньше, чем у Ab1. В другом варианте осуществления

k_{assoc} составляет меньше чем $5,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. В другом варианте осуществления K_{Dissoc} (или скорость диссоциации) больше чем у Ab1. В другом варианте осуществления K_{Dissoc} составляет больше чем $1,5 \times 10^3 \text{ c}^{-1}$.

[0158] Антитела против PD-L1 по настоящему изобретению также могут быть описаны или определены с точки зрения их аффинности связывания с PD-L1 (например, PD-L1 человека). В некоторых вариантах осуществления предпочтительные аффинности связывания включают аффинности с константой диссоциации или K_D больше чем 2,7 нМ, 5 нМ, 6 нМ, 7 нМ, 8 нМ, 9 нМ, 10 нМ, 15 нМ, 20 нМ, 25 нМ, 30 нМ, 40 нМ, 50 нМ, 60 нМ, 70 нМ, 80 нМ, 90 нМ, 100 нМ, 110 нМ, 120 нМ, 130 нМ, 140 нМ, 150 нМ, 200 нМ, 250 нМ, 300 нМ, 400 нМ или 500 нМ. В некоторых вариантах осуществления предпочтительные антитела против PD-L1 обладают аффинностью связывания от 3 нМ до 300 нМ, от 3 нМ до 200 нМ, от 3 нМ до 100 нМ, от 3 нМ до 50 нМ, от 3 нМ до 40 нМ, от 3 нМ до 20 нМ, от 3 нМ до 15 нМ, от 5 нМ до 300 нМ и от 5 нМ до 15 нМ. В некоторых вариантах осуществления предпочтительные антитела против PD-L1 обладают аффинностью связывания, по меньшей мере, в 2, 3, 3,7, 4 или 5 раз больше, чем аффинность связывания Ab1. В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления аффинность связывания представляет собой аффинность моновалентного связывания.

[0159] В некоторых вариантах осуществления связывание антитела против PD-L1 по настоящему изобретению зависит от pH, так что антитело демонстрирует дифференциальное связывание в пределах градиента pH. В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-L1 демонстрирует максимальное связывание при pH примерно 4 и pH примерно 10. В некоторых вариантах осуществления максимальное связывание находится в диапазоне pH от примерно 6 до примерно 9. В некоторых вариантах осуществления максимальное связывание находится в диапазоне pH от примерно 6,5 до примерно 8.

[0160] Предпочтительные антитела по изобретению ингибируют злокачественное новообразование (например, рост клеток, метастазирование и/или гибель организмов), как показано на опухолевых клетках, размножающихся в культуре, в модели на животных или в клинических испытаниях. Животные модели могут быть созданы путем имплантации линий опухолевых клеток человека, экспрессирующих PD-L1, в соответствующие штаммы грызунов с иммунодефицитом, например бестимусных голых мышей или мышей SCID. Эти линии опухолевых клеток могут быть созданы у иммунодефицитных грызунов-хозяев либо в виде солидной опухоли при подкожных инъекциях, либо в виде диссеминированных опухолей при внутривенных инъекциях.

[0161] После создания в организме хозяина эти модели опухолей можно применять для оценки терапевтической эффективности антител против PD-L1 или их конъюгированных форм, как описано в Примерах.

[0162] Как правило, антитела против PD-L1 и/или конъюгаты антитела против PD-L1-лекарственное средство по настоящему изобретению связывают PD-L1, например, человеческий PD-L1, и оказывают цитостатическое и цитотоксическое действие на

злокачественные клетки, такие как опухолевые клетки. Концентрация, необходимая для снижения жизнеспособности на 50% по сравнению с необработанными клетками, или x_{50} , или IC50, является одним из способов измерения цитотоксичности антител против PD-L1 и/или конъюгатов ADC против PD-L1. Предпочтительные антитела и/или ADC по изобретению проявляют повышенную цитотоксичность и x_{50} по сравнению с таковой у антител Ab1 и/или ADC. В одном варианте осуществления антитело против PD-L1, конъюгированное с vcMMAE по изобретению, демонстрирует x_{50} от 10 нг/мл до 30 нг/мл или от 15 нг/мл до 25 нг/мл в клеточной линии BXPС3. В другом варианте осуществления антитело против PD-L1, конъюгированное с vcMMAE по изобретению, демонстрирует x_{50} от 15 нг/мл до 55 нг/мл или от 20 нг/мл до 50 нг/мл в клеточной линии MDA-MB-231. В другом варианте осуществления антитело против PD-L1, конъюгированное с vcMMAE по изобретению, демонстрирует x_{50} от 1 нг/мл до 7 нг/мл или от 2 нг/мл до 5 нг/мл в клеточной линии KARPAS 299. В другом варианте осуществления антитело против PD-L1, конъюгированное с vcMMAE по изобретению, демонстрирует x_{50} от 15 нг/мл до 40 нг/мл или от 20 нг/мл до 35 нг/мл в клеточной линии L540CY. В одном варианте осуществления антитело против PD-L1, конъюгированное с камптотецином по изобретению, демонстрирует x_{50} от 12 нг/мл до 70 нг/мл или от 15 нг/мл до 65 нг/мл в клеточной линии BXPС3. В другом варианте осуществления антитело против PD-L1, конъюгированное с камптотецином по изобретению, демонстрирует x_{50} от 3 нг/мл до 20 нг/мл или от 5 нг/мл до 17 нг/мл в клеточной линии MDA-MB-231. В другом варианте осуществления антитело против PD-L1, конъюгированное с камптотецином по изобретению, демонстрирует x_{50} от 1 нг/мл до 18 нг/мл или от 3 нг/мл до 15 нг/мл в клеточной линии KARPAS 299. В другом варианте осуществления антитело против PD-L1, конъюгированное с камптотецином по изобретению, демонстрирует x_{50} от 1 нг/мл до 20 нг/мл или от 1 нг/мл до 15 нг/мл в клеточной линии L540CY.

[0163] Как правило, антитела против PD-L1 и/или конъюгаты антитело против PD-L1-лекарственное средство по настоящему изобретению интернализуются в клетки, такие как опухолевые клетки. Одним из способов измерения интернализации является использование pH-чувствительного конъюгата антител, который испускает флуоресцентный сигнал при интернализации в клеточном анализе. Эта общая интернализация антитела может быть определена количественно по площади под кривой (или AUC) флуоресцентного сигнала с течением времени. Для этого количественного определения можно использовать анализ интернализации FabFluor (IncuCyte®). Предпочтительные антитела и/или ADC по изобретению демонстрируют повышенную общую интернализацию по сравнению с Ab1 и/или ADC. В одном варианте осуществления антитело против PD-L1 или ADC по изобретению демонстрирует увеличение AUC от 9% до 155% по сравнению с AUC Ab1. В другом варианте осуществления антитело против PD-L1 или ADC по изобретению демонстрирует увеличение AUC от 40% до 130% или от 40% до 50% по сравнению с AUC Ab1 при тестировании на клеточной линии 786-О. В другом варианте осуществления антитело

против PD-L1 или ADC по изобретению демонстрирует увеличение AUC от 90% до 100% или от 90% до 95% по сравнению с AUC Ab1 при тестировании на клеточной линии A375. В другом варианте осуществления антитело против PD-L1 или ADC по изобретению демонстрирует увеличение AUC от 85% до 155% или от 85% до 90% по сравнению с AUC Ab1 при тестировании на клеточной линии BXP3. В другом варианте осуществления антитело против PD-L1 или ADC по изобретению демонстрирует увеличение AUC от 9% до 40% или от 9% до 13% по сравнению с AUC Ab1 при тестировании на клеточной линии ES-2. В другом варианте осуществления антитело против PD-L1 или ADC по изобретению демонстрирует увеличение AUC от 75% до 145% или от 75% до 80% по сравнению с AUC Ab1 при тестировании на клеточной линии MDA-MB-231.

[0164] Антитела против PD-L1 согласно настоящему изобретению предпочтительно являются моноклональными и могут представлять собой полиспецифические, человеческие, гуманизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, фрагменты, продуцируемые Fab-экспрессирующей библиотекой, и PD-L1-связывающие фрагменты любого из вышеуказанных. В некоторых вариантах осуществления антитела против PD-L1 согласно настоящему изобретению специфически связываются с PD-L1. Молекулы иммуноглобулина согласно настоящему описанию 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 иммуноглобулина. В одном варианте осуществления антитела против PD-L1 согласно настоящему изобретению относятся к типу IgG1.

[0165] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела против PD-L1 представляют собой антигенсвязывающие фрагменты (например, человеческие антигенсвязывающие фрагменты), как описано в настоящем документе, и включают, помимо прочего, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, Fv с дисульфидной связью (sdFv) и фрагменты, содержащие либо домен VL, либо VH. Антигенсвязывающие фрагменты, в том числе одноцепочечные антитела, могут содержать вариабельную(ые) область(и) отдельно или в комбинации с полностью или частично из следующего: шарнирной областью, доменами CH1, CH2, CH3 и CL. Также в настоящее изобретение включены антигенсвязывающие фрагменты, содержащие любую комбинацию вариабельной(вариабельных) области(областей) с шарнирной областью, доменами CH1, CH2, CH3 и CL. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела против PD-L1 или их антигенсвязывающие фрагменты являются человеческими, мышинными (например, мышинными и крысиными), ослиными, овечьими, кроличьими, козьими, морских свинок, верблюжьими, лошадиными или куриными.

[0166] Антитела против PD-L1 по настоящему изобретению могут быть моносpezifичными, биспецифическими, триспецифичными или более полиспецифичными. Полиспецифичные антитела могут быть специфичными к разным эпитопам PD-L1 или могут быть специфичными как к PD-L1, так и к гетерологичному

белку. См., например, публикации PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Пат. США No. 4474893; 4714681; 4925648; 5573920; 5601819; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148: 1547-1553.

[0167] Антитела против PD-L1 по настоящему изобретению могут быть описаны или определены с точки зрения конкретных CDR, которые они содержат. Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR или FR можно легко определить с использованием любой из ряда хорошо известных схем, включая схемы, описанные Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD («Kabat» numbering scheme); Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 («Chothia» numbering scheme); MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), «Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography», J. Mol. Biol. 262, 732-745», (схема нумерации «Контакт»); Lefranc MP et al., «IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains», Dev Comp Immunol, 2003 Jan; 27(1):55-77 (схема нумерации «IMGT»); Honegger A и Plückthun A, «Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool», 2001 Jun 8;309(3):657-70, (схема нумерации «Aho»); и Martin et al., «Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm», PNAS, 1989, 86(23):9268-9272 (схема нумерации «AbM»). Границы данной CDR могут варьироваться в зависимости от схемы, используемой для идентификации. В некоторых вариантах осуществления следует понимать, что «CDR» или «определяющая комплементарность область» или отдельные указанные CDR (например, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) данного антитела или его области (например, его вариабельная область) охватывают (или конкретную) CDR, как определено любой из вышеупомянутых схем. Например, если указано, что конкретная CDR (например, CDR-H3) содержит аминокислотную последовательность соответствующей CDR в данной аминокислотной последовательности VH- или VL-области, то подразумевается, что такая CDR имеет последовательность соответствующий CDR (например, CDR-H3) в пределах вариабельной области, как определено любой из вышеупомянутых схем. Может быть указана схема идентификации конкретной CDR или конкретных CDR, например, CDR, как определено методом Kabat, Chothia, AbM или IMGT.

[0168] Последовательности CDR антител против PD-L1 и конъюгатов антител против PD-L1-лекарственное средство, описанные в настоящем документе, соответствуют схеме нумерации Kabat, как описано Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.

[0169] В одном аспекте в настоящем документе предложено антитело против PD-L1 и/или конъюгат антител против PD-L1-лекарственное средство, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:14, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15; и/или при этом переменная область легкой цепи содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18, где CDR антитела против PD-L1 определены по схеме нумерации Kabat.

[0170] В одном аспекте в настоящем описании предложено антитело против PD-L1 и/или конъюгат антитела против PD-L1-лекарственное средство, содержащее переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11, и содержащий переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12. В одном аспекте в настоящем описании предложено антитело против PD-L1 и/или конъюгат антитела против PD-L1-лекарственное средство, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и содержащее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10.

[0171] В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено антитело против PD-L1 и/или конъюгат антитела против PD-L1-лекарственное средство, содержащее переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции по сравнению с эталонной последовательностью и сохраняет способность связываться с PD-L1 (например, с человеческим PD-L1). В некоторых вариантах осуществления в SEQ ID NO:11 заменены, вставлены и/или удалены в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) происходят в областях за пределами CDR (т. е. в FR). В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-L1 содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO:11, включая посттрансляционные модификации этой последовательности.

[0172] В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено антитело против PD-L1 и/или конъюгат антитела против PD-L1-лекарственное средство, содержащее переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:12. В некоторых вариантах

осуществления вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:12, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции по сравнению с эталонной последовательностью и сохраняет способность связываться с PD-L1 (например, с человеческим PD-L1). В некоторых вариантах осуществления в SEQ ID NO:12 заменены, вставлены и/или удалены в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) происходят в областях за пределами CDR (т. е. в FR). В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-L1 содержит последовательность вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO:12, включая посттрансляционные модификации этой последовательности.

[0173] В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено антитело против PD-L1 и/или конъюгат антитело против PD-L1-лекарственное средство, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции по сравнению с эталонной последовательностью и сохраняет способность связываться с PD-L1 (например, с человеческим PD-L1). В некоторых вариантах осуществления в SEQ ID NO:1 заменены, вставлены и/или удалены в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь содержит одну точечную мутацию относительно SEQ ID NO:1. В дополнительных вариантах осуществления одна точечная мутация локализована в области CDR.

[0174] В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено антитело против PD-L1 и/или конъюгат антитело против PD-L1-лекарственное средство, содержащее вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2, содержит замены (например,

консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности и сохраняет способность связываться с PD-L1 (например, с человеческим PD-L1). В некоторых вариантах осуществления в SEQ ID NO:2 заменены, вставлены и/или удалены в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит одну точечную мутацию относительно SEQ ID NO:2. В дополнительных вариантах осуществления одна точечная мутация локализована в области CDR.

[0175] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-L1 или антитело против PD-L1 в составе конъюгата антитело против PD-L1-лекарственное средство представляет собой моноклональное антитело.

[0176] Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющих тяжелые цепи, которые обозначены α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Классы γ и α дополнительно делятся на подклассы, например, у людей экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Антитела IgG1 могут существовать в нескольких полиморфных вариантах, называемых аллотипами (рассмотрено в Jefferis and Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 4 1-7), любые из которых подходят для использования в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения. Обычными аллотипическими вариантами в человеческих популяциях являются те, которые обозначаются буквами a, f, n, z или их комбинациями. В любом из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело может содержать Fc-область тяжелой цепи, содержащую Fc-область IgG человека. В дополнительных вариантах осуществления Fc-область IgG человека содержит IgG1 человека.

[0177] Антитела также включают производные, которые модифицированы, т. е. путем ковалентного присоединения любого типа молекулы к антителу, так что ковалентное присоединение не предотвращает связывание антитела с PD-L1, или оказание цитостатического или цитотоксического действия на клетки. Например, но не в качестве ограничения, производные антител включают антитела, которые были модифицированы, например, гликозилированием, ацетилированием, ПЭГилированием, фосфилированием, амидированием, дериватизацией известными защитными/блокирующими группами, протеолитическим расщеплением, связыванием с клеточным лигандом или другим белком и т. д. Любая из многочисленных химических модификаций может быть осуществлена известными методами, включая, но не ограничиваясь ими, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т. д. Кроме того, производное может содержать одну или больше неклассических аминокислот.

Гуманизированные антитела

[0178] Гуманизированное антитело представляет собой генетически сконструированное антитело, в котором CDR «донорного» антитела, не являющегося человеческим, трансплантированы к человеческим «акцепторным» последовательностям антител (см., например, Queen, US 5530101 и 5585089; Winter, US 5225539; Carter, US

6407213; Adair, US 5859205; и Foote, US 6881557). Последовательности акцепторного антитела могут представлять собой, например, последовательность зрелого человеческого антитела, составную часть таких последовательностей, консенсусную последовательность последовательностей человеческого антитела или последовательность зародышевой области. Предпочтительной акцепторной последовательностью для тяжелой цепи является экзон VH1-2 VH зародышевой линии (также обозначаемый в литературе как HV1-2) (Shin et al., 1991, EMBO J. 10:3641-3645), а для шарнирной области (JH), экзон JH-6 (Mattila et al., 1995, Eur. J. Immunol.). В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции по сравнению с эталонной последовательностью и сохраняет способность связываться с PD-L1 (например, с человеческим PD-L1). Для легкой цепи предпочтительной акцепторной последовательностью является экзон VK2-30 (также обозначаемый в литературе как KV2-30), а для шарнирной области экзон JK-4 (Hieter et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:1516-1522). Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, имеющее некоторые или все CDR полностью или по существу из донорного антитела и каркасные последовательности переменной области и константные области, если они присутствуют, полностью или по существу из последовательностей человеческого антитела. Аналогично, гуманизированная тяжелая цепь имеет по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR полностью или по существу из тяжелой цепи донорного антитела, а каркасную последовательность переменной области тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, если они присутствуют, по существу из каркасной последовательности переменной области тяжелой цепи человека и последовательности константной области. Аналогичным образом, гуманизированная легкая цепь имеет по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR полностью или по существу из легкой цепи донорного антитела, а каркасную последовательность переменной области легкой цепи и константную область легкой цепи, если они присутствуют, по существу из каркасной последовательности переменной области легкой цепи человека и последовательности константной области. Помимо нанокантител и dAb, гуманизированное антитело содержит гуманизированную тяжелую цепь и гуманизированную легкую цепь. CDR в гуманизированном антителе по существу происходит от соответствующей CDR в антителе, не являющемся человеческим, когда по меньшей мере 60%, 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков (как определено Kabat) идентичны между соответствующими CDR. Каркасные последовательности переменной области цепи антитела или константная область цепи антитела по существу происходят из каркасных последовательностей переменной области человека или константной области человека, соответственно, когда по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков, определенных Kabat, идентичны. В некоторых вариантах осуществления

антитела против PD-L1 по изобретению представляют собой гуманизированные антитела.

[0179] Хотя гуманизированные антитела часто включают все шесть CDR (предпочтительно, как определено Kabat) мышиного антитела, они также могут быть получены с использованием меньше чем всех CDR (например, по меньшей мере 3, 4 или 5) CDR мышиного антитела (например, Pascalis et al., *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos et al., *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., *Journal of Immunology*, 164:1432-1441, 2000).

ВЫБОР КОНСТАНТНОЙ ОБЛАСТИ

[0180] Вариабельные области тяжелой и легкой цепи гуманизированных антител могут быть связаны по меньшей мере с частью константной области человека. Выбор константной области частично зависит от того, желательны ли антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, антителозависимый клеточный фагоцитоз и/или комплемент-зависимая цитотоксичность. Например, человеческие изотипы IgG1 и IgG3 обладают сильной комплемент-зависимой цитотоксичностью, человеческий изотип IgG2 слабой комплемент-зависимой цитотоксичностью и человеческий IgG4 не обладает комплемент-зависимой цитотоксичностью. Человеческие IgG1 и IgG3 также индуцируют больше сильные клеточно-опосредованные эффекторные функции, чем человеческие IgG2 и IgG4. Константные области легкой цепи могут представлять собой лямбда или каппа. Антитела могут быть экспрессированы в виде тетрамеров, содержащих две легкие и две тяжелые цепи, в виде отдельных тяжелых цепей, легких цепей, в виде Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, или в виде одноцепочечных антител, в которых вариабельные домены тяжелой и легкой цепи связаны через спейсер.

[0181] Константные области человека демонстрируют аллотипические вариации и изоаллотипические вариации между разными индивидуумами, то есть константные области могут различаться у разных людей в одном или больше полиморфных положениях. Изоаллотипы отличаются от аллотипов тем, что сыворотка, распознающая изоаллотип, связывается с непалиморфной областью одного или больше других изотипов.

[0182] Одна или несколько аминокислот на амино- или карбоксиконце легкой и/или тяжелой цепи, такие как C-концевой лизин тяжелой цепи, могут отсутствовать или быть дериватизированы в части или во всех молекулах. Замены могут быть сделаны в константных областях для снижения или усиления эффекторной функции, такой как комплемент-опосредованная цитотоксичность или ADCC (см., например, Winter et al., патент США № 5624821; Tso et al., патент США № 5834597; и Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4005, 2006), или для продления периода полувыведения у человека (см., например, Hinton et al., *J. Biol. Chem.* 279:6213, 2004).

[0183] Примеры замены включают аминокислотную замену нативной аминокислоты на остаток цистеина, введенный в положение аминокислоты 234, 235, 237, 239, 267, 298, 299, 326, 330 или 332, предпочтительно мутацию S239C в человеческом изотипе IgG1 (US 20100158909). Наличие дополнительного остатка цистеина делает возможным образование межцепочечной дисульфидной связи. Такое образование

межцепочечной дисульфидной связи может вызывать стерические затруднения, тем самым снижая аффинность взаимодействия связывания Fc-область-FcγR. Остатки цистеина, введенные в Fc-область константной области IgG или вблизи него, также могут служить сайтами для конъюгации с терапевтическими агентами (т. е., конденсация цитотоксических лекарственных средств с использованием тиольных специфических реагентов, таких как малеимидные производные лекарственных средств). Присутствие терапевтического агента вызывает стерические затруднения, тем самым дополнительно снижая аффинность взаимодействия связывания Fc-область-FcγR. Другие замены в любом из положений 234, 235, 236 и/или 237 снижают аффинность к Fcγ-рецепторам, в частности к FcγRI-рецептору (см., например, патент США 6624821, патент США 5624821).

[0184] Период полужизни антитела *in vivo* также может влиять на его эффекторные функции. Период полужизни антитела может быть увеличен или уменьшен для изменения его терапевтической активности. FcRn представляет собой рецептор, структурно сходный с антигеном МНС класса I, который нековалентно связывается с β2-микроглобулином. FcRn регулирует катаболизм IgG и их трансцитоз в тканях (Ghetie and Ward, 2000, *Annu. Rev. Immunol.* 18:739-766; Ghetie and Ward, 2002, *Immunol. Res.* 25:97-113). Взаимодействие IgG-FcRn происходит при pH 6 (pH внутриклеточных везикул), но не при pH 7,4 (pH крови); это взаимодействие позволяет рециркуляцию IgG обратно в кровоток (Ghetie and Ward, 2000, *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766; Ghetie and Ward, 2002, *Immunol. Res.* 25:97-113). Была картирована область IgG1 человека, участвующая в связывании FcRn (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). Замещения аланином в положениях Pro238, Thr256, Thr307, Gln311, Asp312, Glu380, Glu382 или Asn434 человеческого IgG1 усиливают связывание FcRn (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). Молекулы IgG1, несущие эти замены, имеют больше длительный период полужизни в сыворотке. Следовательно, эти модифицированные молекулы IgG1 могут выполнять свои эффекторные функции и, следовательно, проявлять свою терапевтическую эффективность в течение больше длительного периода времени по сравнению с немодифицированным IgG1. Другие иллюстративные замены для увеличения связывания с FcRn включают Gin в положении 250 и/или Leu в положении 428. Нумерация EU используется для всех положений в константной области.

[0185] Олигосахариды, ковалентно присоединенные к консервативному Asn297, участвуют в способности области Fc IgG связывать FcγR (Lund et al., 1996, *J. Immunol.* 157:4963-69; Wright and Morrison, 1997, *Trends Biotechnol.* 15:26-31). Конструирование этой гликоформы на IgG может значительно улучшить IgG-опосредованную ADCC. Добавление бисектных модификаций N-ацетилглюкозамина (Umana et al., 1999, *Nat. Biotechnol.* 17:176-180; Davies et al., 2001, *Biotech. Bioeng.* 74:288-94) в эту гликоформу или удаление фукозы (Shields et al., 2002, *J. Biol. Chem.* 277:26733-40; Shinkawa et al., 2003, *J. Biol. Chem.* 278:6591-604; Niwa et al., 2004, *Cancer Res.* 64:2127-33) из этой гликоформы являются двумя примерами конструирования Fc IgG, которое улучшает связывание между Fc IgG и FcγR, тем самым усиливая активность ADCC, опосредованную Ig.

[0186] Системная замена экспонируемых растворителю аминокислот Fc-области IgG1 человека привела к образованию вариантов IgG с измененной аффинностью связывания FcγR (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). По сравнению с родительским IgG1 подгруппа этих вариантов, включающая замены в Thr256/Ser298, Ser298/Glu333, Ser298/Lys334 или Ser298/Glu333, Lys334 на Ala, демонстрирует одновременно повышенную аффинность связывания с FcγR и активность ADCC (Shields et al, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604; Okazaki et al., 2004, *J. Mol. Biol.* 336:1239-49).

[0187] Активность фиксации комплемента антител (как связывание C1q, так и активность CDC) может быть улучшена заменой Lys326 и Glu333 (Idusogie et al., 2001, *J. Immunol.* 166:2571-2575). Те же самые замены в осто́ве человеческого IgG2 могут преобразовать изотип антитела, который плохо связывается с C1q и имеет серьезный дефицит активности активации комплемента, в изотип, который может одновременно связывать C1q и опосредовать CDC (Idusogie et al, 2001, *J. Immunol.* 166:2571-75). Несколько других методов также применялись для улучшения активности антител по фиксации комплемента. Например, трансплантация 18-аминокислотного карбоксиконцевого хвостового фрагмента IgM на карбоксиконец IgG значительно усиливает их CDC-активность. Это наблюдается даже с IgG4, который в норме не имеет детектируемой CDC-активности (Smith et al., 1995, *J. Immunol.* 154:2226-36). Кроме того, замена Ser444, расположенного вблизи карбоксиконца тяжелой цепи IgG1, на Cys индуцировала димеризацию IgG1 «хвост к хвосту» с 200-кратным увеличением активности CDC по сравнению с мономерным IgG1 (Shopes et al., 1992, *J. Immunol.* 148:2918-22). Кроме того, биспецифическая конструкция диатела со специфичностью в отношении C1q также придает активность CDC (Kontermann et al., 1997, *Nat. Biotech.* 15:629-31).

[0188] Активность комплемента может быть снижена путем мутации по меньшей мере одного из аминокислотных остатков 318, 320 и 322 тяжелой цепи на остаток с другой боковой цепью, такой как Ala. Другие алкилзамещенные неионные остатки, такие как Gly, Leu или Val, или такие ароматические неполярные остатки, как Phe, Tyr, Trp и Pro вместо любого из трех остатков, также уменьшают или устраняют связывание C1q. Ser, Thr, Cys и Met можно использовать в остатках 320 и 322, но не 318, для снижения или отмены активности связывания C1q.

[0189] Замена остатка 318 (Glu) полярным остатком может изменить, но не отменить активность связывания C1q. Замена остатка 297 (Asn) на Ala приводит к исчезновению литической активности, но лишь незначительно снижает (примерно в три раза) аффинность к C1q. Это изменение разрушает сайт гликозилирования и присутствие углевода, необходимого для активации комплемента. Любая другая замена в этом сайте также разрушает сайт гликозилирования. Следующие мутации и любая их комбинация также снижают связывание C1q: D270A, K322A, P329A и P31IS (см. WO 06/036291). Мутация L234A/L235A (или мутация LALA) также снижает связывание C1q, а также связывание FcγR. В одном варианте осуществления антитело против PD-L1 по

изобретению включает мутацию L234A/L235A.

[0190] Ссылка на константную область человека включает константную область с любым природным аллотипом или любую пермутацию остатков, занимающих полиморфные положения в природных аллотипах. Кроме того, может присутствовать до 1, 2, 5 или 10 мутаций относительно природной константной области человека, таких как указанные выше, для уменьшения связывания с рецептором Fc γ или увеличения связывания с FcRN.

V. Экспрессия рекомбинантных антител

[0191] Гуманизированные антитела обычно получают путем рекомбинантной экспрессии. Рекомбинантные полинуклеотидные конструкции обычно включают последовательность контроля экспрессии, функционально связанную с кодирующими последовательностями цепей антител, включая природные или гетерологичные промоторные области. Предпочтительно последовательности контроля экспрессии представляют собой эукариотические промоторные системы в векторах, способных трансформировать или трансфецировать эукариотические клетки-хозяева. После включения вектора в соответствующего хозяина, его поддерживают в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии нуклеотидных последовательностей, а также для сбора и очистки перекрестно реактивных антител.

[0192] Клетки млекопитающих являются предпочтительным хозяином для экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты. См. Winnacker, *From Genes to Clones* (VCH Publishers, NY, 1987). В данной области техники был разработан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные гетерологичные белки, и они включают клеточные линии CHO (например, DG44), различные клеточные линии COS, клетки HeLa, клетки HEK293, L-клетки и миеломы, не продуцирующие антител, включающие Sp2/0 и NS0. Предпочтительно клетки не являются человеческими. Экспрессирующие векторы для этих клеток могут включать последовательности контроля экспрессии, такие как последовательность точки начала репликации, промотор, энхансер (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), и необходимые сайты обработки информации, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминаторов транскрипции. Предпочтительными последовательностями контроля экспрессии являются промоторы, полученные из эндогенных генов, цитомегаловируса, SV40, аденовируса, бычьего папилломавируса и т. п. См. Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

[0193] После экспрессии антитела могут быть очищены в соответствии со стандартными процедурами в данной области, включая очистку ВЭЖХ, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и т. п. (см. в целом Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

VI. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

[0194] Изобретение дополнительно относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим любую из гуманизированных тяжелых и легких цепей, описанных выше.

Как правило, нуклеиновые кислоты также кодируют сигнальный пептид, слитый со зрелыми тяжелой и легкой цепями. Кодирующие последовательности нуклеиновых кислот могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии кодирующих последовательностей, таких как промотор, энхансер, сайт связывания рибосомы, сигнал терминации транскрипции и т. п. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут встречаться в изолированной форме или могут быть клонированы в один или больше векторов. Нуклеиновые кислоты могут быть синтезированы, например, твердофазным синтезом или ПЦР перекрывающихся олигонуклеотидов. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи, могут быть объединены в одну непрерывную нуклеиновую кислоту, например, в экспрессирующем векторе, или могут быть разделены, например, каждая клонирована в свой собственный экспрессирующий вектор.

[0195] В некоторых аспектах в настоящем описании также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе. Кроме того, в настоящем описании предложены векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе. Кроме того, в настоящем описании предложены клетки-хозяева, экспрессирующие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе. Кроме того, в настоящем описании предложены клетки-хозяева, содержащие векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе.

[0196] Антитела против PD-L1, описанные в настоящем документе, могут быть получены хорошо известными рекомбинантными методами с использованием хорошо известных систем экспрессирующих векторов и клеток-хозяев. В одном варианте осуществления антитела получают в клетке CHO с использованием системы экспрессирующих векторов GS, как описано в De la Cruz Edmunds et al., 2006, *Molecular Biotechnology* 34; 179-190, EP216846, Пат. США № 5981216, WO 87/04462, EP323997, Пат. США № 5591639, Пат. США № 5658759, EP338841, Пат. США № 5879936 и Пат. США № 5891693.

[0197] Моноклональные антитела против PD-L1, описанные в настоящем документе, могут, например, могут быть получены методом гибридомы, впервые описанным Kohler et al., *Nature*, 256, 495 (1975), или могут быть получены методом рекомбинантной ДНК. Моноклональные антитела также могут быть выделены из библиотек фаговых антител с использованием методик, описанных, например, в Clackson et al., *Nature*, 352, 624-628 (1991) и Marks et al., *JMol. Biol.*, 222(3): 581-597 (1991). Моноклональные антитела могут быть получены из любого подходящего источника. Таким образом, например, моноклональные антитела могут быть получены из гибридом, приготовленных из мышиных В-клеток селезенки, полученных из мышей,

иммунизированных с использованием антигена, представляющего интерес, например, в форме клеток, экспрессирующих на своей поверхности антиген, или в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген, представляющий интерес. Моноклональные антитела также могут быть получены из гибридом, выделенных из клеток, экспрессирующих антитела, принадлежащих иммунизированному человеку или отличным от человека животным, таким как крысы, собаки, приматы и т. д.

КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

[0198] Антитела против PD-L1 могут быть конъюгированы с цитотоксическими или цитостатическими фрагментами (включая их фармацевтически совместимые соли) с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). Особенно подходящими фрагментами для конъюгации с антителами являются цитотоксические агенты (например, химиотерапевтические агенты), ферменты, превращающие пролекарства, радиоактивные изотопы или соединения или токсины (эти фрагменты в совокупности относятся к терапевтическим агентам). Например, антитело против PD-L1 может быть конъюгировано с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический агент, или токсином (например, цитостатическим или цитотоксическим агентом, таким как, например, абрин, рицин А, экзотоксин синегнойной палочки или дифтерийный токсин).

[0199] Антитело против PD-L1 может быть конъюгировано с ферментом, превращающим пролекарство. Фермент, превращающий пролекарство, может быть рекомбинантно слит с антителом или химически конъюгирован с ним с использованием известных способов. Примерами ферментов, превращающих пролекарства, являются карбоксипептидаза G2, бета-глюкуронидаза, пенициллин-V-амидаза, пенициллин-G-амидаза, β -лактамаза, β -глюкозидаза, нитроредуктаза и карбоксипептидаза А.

[0200] Методы конъюгации терапевтических агентов с белками и, в частности, с антителами хорошо известны. (См., например, Arnon et al., «Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs in Cancer Therapy», в Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy (Reisfeld et al. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom et al., «Antibodies For Drug Delivery,» in Controlled Drug Delivery (Robinson et al. eds., Marcel Dekker, Inc., 2nd ed. 1987); Thorpe, «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,» in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (Pinchera et al. eds., 1985); «Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy,» in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy (Baldwin et al. eds., Academic Press, 1985); и Thorpe et al, 1982, Immunol. Rev. 62:119-58. См. также, например, публикацию PCT WO 89/12624.)

[0201] Терапевтический агент может быть конъюгирован таким образом, что его активность снижается, если только он не отщепляется от антитела (например, путем гидролиза, деградации антитела или расщепляющего агента). Такой терапевтический агент присоединен к антителу с помощью расщепляемого линкера, который чувствителен к расщеплению во внутриклеточной среде опухолевой клетки, экспрессирующей PD-L1, но по существу не чувствителен к внеклеточной среде, так что конъюгат отщепляется от

антитела, когда он интернализуется опухолевой клеткой, экспрессирующей PD-L1 (например, в эндосомах или, например, благодаря чувствительности к pH или чувствительности к протеазе, в лизосомной среде или в кавеоларной среде).

[0202] Обычно ADC содержит линкерную область между терапевтическим агентом и антителом против PD-L1. Как отмечалось выше, обычно линкер расщепляется во внутриклеточных условиях, так что расщепление линкера высвобождает терапевтический агент из антитела во внутриклеточной среде (например, внутри лизосомы, или эндосомы, или кавеолы). Линкер может быть, например, пептидным линкером, который расщепляется внутриклеточной пептидазой или протеазой, включая лизосомную или эндосомную протеазу. Обычно пептидный линкер имеет длину по меньшей мере две аминокислоты или по меньшей мере три аминокислоты. Расщепляющие агенты могут включать катепсины В и D и плазмин (см., например, Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123). Наиболее типичными являются пептидные линкеры, расщепляемые ферментами, присутствующими в клетках, экспрессирующих PD-L1. Например, можно использовать пептидный линкер, расщепляемый тиол-зависимой протеазой катепсин-В, которая в высокой степени экспрессируется в опухолевой ткани (например, линкер, содержащий пептид Phe-Leu или Gly-Phe-Leu-Gly). Другие такие линкеры описаны, например, в Патенте США № 6214345. В конкретных вариантах осуществления пептидный линкер, расщепляемый внутриклеточной протеазой, содержит линкер Val-Cit или дипептид Phe-Lys (см., например, патент США 6214345, в котором описан синтез доксорубина с линкером Val-Cit). Одно из преимуществ применения внутриклеточного протеолитического высвобождения терапевтического агента, заключается в том что агент, как правило, ослаблен при конъюгации, а сывороточные стабильности конъюгатов, как правило, являются высокими.

[0203] Расщепляемый линкер может быть pH-чувствительным, т. е. чувствительным к гидролизу при определенных значениях pH. Как правило, pH-чувствительный линкер является гидролизуемым в кислых условиях. Например, можно использовать чувствительный к кислотам линкер, который гидролизуется в лизосоме (например, гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, цис-аконитовый амид, ортоэфир, ацеталь, кеталь и т. п.). (См., например, Пат. США № 5122368; 5824805; 5622929; Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville et al, 1989, *Biol. Chem.* 264: 14653-14661). Такие линкеры относительно стабильны в условиях нейтрального pH, например, в крови, но нестабильны при pH ниже 5,5 или 5, приблизительно pH лизосомы. В некоторых вариантах осуществления гидролизуемый линкер представляет собой тиоэфирный линкер (такой как, например, простой тиоэфир, присоединенный к терапевтическому агенту через ацилгидразоновую связь (см., например, Патент США № 5622929)).

[0204] Другие линкеры расщепляются в восстанавливающих условиях (например, дисульфидный линкер). Дисульфидные линкеры включают те, которые могут быть образованы с использованием SATA (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат), SPDP (N-

сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутират) и SMPT (N-сукцинимидил-оксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридил-дитио)толуол), SPDB и SMPT. (См., например, Thorpe et al, 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., В *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimage and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. См. также Патент США No. 4880935.)

[0205] Линкер также может представлять собой малонатный линкер (Johnson et al., 1995, *Anticancer Res.* 15:1387-93), малеимидобензоильный линкер (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1299-1304), или аналог 3'-N-амида (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12). Линкер также может представлять собой малонатный линкер (Johnson et al., 1995, *Anticancer Res.* 15:1387-93), малеимидобензоильный линкер (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1299-1304), или аналог 3'-N-амида (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12).

[0206] Линкер также может быть нерасщепляемым линкером, таким как малеимидо-алкилен- или малеимид-арильный линкер, который непосредственно присоединен к терапевтическому агенту (например, лекарственному средству). Активный линкер лекарственного средства высвобождается при деградации антитела.

[0207] Как правило, линкер по существу не чувствителен к внеклеточной среде, что означает, что не больше чем примерно 20%, как правило, не больше чем примерно 15%, чаще не больше чем примерно 10% и еще чаще не больше чем примерно 5%, не больше чем примерно 3% или не больше чем примерно 1% линкеров в образце ADC расщепляется, когда ADC присутствует во внеклеточной среде (например, в плазме).

[0208] Является ли линкер по существу нечувствительным к внеклеточной среде, можно определить, например, путем независимой инкубации с плазмой как (а) ADC («образец ADC»), так и (b) равного молярного количества неконъюгированного антитела или терапевтического агента. («контрольный образец») в течение заданного периода времени (например, 2, 4, 8, 16 или 24 часов), а затем путем сравнения количества неконъюгированного антитела или терапевтического агента, присутствующего в образце ADC, с количеством, присутствующим в контрольном образце, по измерениям, например, высокоэффективной жидкостной хроматографией.

[0209] Линкер также может способствовать клеточной интернализации. Линкер может стимулировать клеточную интернализацию при конъюгации с терапевтическим агентом (т. е. в среде фрагмента линкер-терапевтический агент ADC или производного ADC, как описано в настоящем документе). Альтернативно, линкер может способствовать клеточной интернализации при конъюгации как с терапевтическим агентом, так и с антителом против PD-L1 (т. е. в среде ADC, как описано в настоящем документе).

[0210] Антитело против PD-L1 может быть конъюгировано с линкером через гетероатом антитела. Эти гетероатомы могут присутствовать на антителе в его естественном состоянии или могут быть введены в антитело. В некоторых аспектах антитело против PD-L1 будет конъюгировано с линкером через атом азота остатка лизина.

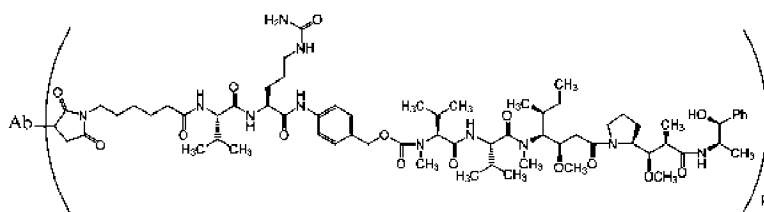
В других аспектах антитело против PD-L1 будет конъюгировано с линкером через атом серы цистеинового остатка. Остаток цистеина может встречаться в природе или быть введенным в антитело. Способы конъюгации линкеров и линкеров-лекарственных средств с антителами через остатки лизина и цистеина известны в данной области.

[0211] Примеры конъюгатов антитело-лекарственное средство включают конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе ауристатина (т. е. лекарственный компонент представляет собой лекарственное средство ауристатин). Ауристатины связывают тубулин, препятствуют динамике микротрубочек, ядерному и клеточному делению и обладают противоопухолевой активностью. Обычно конъюгат антитело-лекарственное средство на основе ауристатина содержит линкер между лекарственным средством на основе ауристатина и антителом против PD-L1. Линкер может представлять собой, например, расщепляемый линкер (например, пептидильный линкер, углеводный линкер) или нерасщепляемый линкер (например, линкер, высвобождаемый при деградации антитела). Ауристатины включают ауристатин Т, MMAF и MMAE. Синтез и структура иллюстративных ауристатинов описаны в публикациях США № 7659241, 7498298, 2009-0111756, 2009-0018086 и 7968687, каждая из которых в полном объеме и для всех целей включена в настоящее описание посредством ссылки.

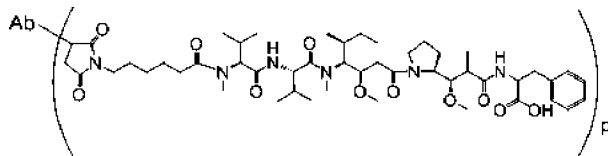
[0212] Примеры конъюгатов антитело-лекарственное средство также включают конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе камптотецина (т. е. лекарственный компонент представляет собой лекарственное средство камптотецин). Камптотецины являются ингибиторами топоизомеразы, которые, как было показано, обладают противоопухолевой активностью. Обычно конъюгат антитело-лекарственное средство на основе камптотецина содержит линкер между лекарственным средством камптотецин и антителом против PD-L1. Линкер может представлять собой, например, расщепляемый линкер (например, пептидильный линкер, углеводный линкер) или нерасщепляемый линкер (например, линкер, высвобождаемый при деградации антитела). Синтез и структура типичных линкеров камптотециновых лекарственных средств описаны в документе PCT/US19/025968 (подана 5 апреля 2019 г.), который в полном объеме и для всех целей включен в настоящий документ посредством ссылки.

[0213] Другие иллюстративные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают майтансиноидные конъюгаты антитело-лекарственное средство (т. е. лекарственный компонент представляет собой майтансиноидное лекарственное средство) и бензодиазепиновые конъюгаты антитело-лекарственное средство (т. е. лекарственный компонент представляет собой бензодиазепин (например, пирроло[1,4]бензодиазепиновые димеры (димер PBD), димеры индолинобензодиазефина и димеры оксазолидинобензодиазефина)).

[0214] Примеры конъюгатов антитело-лекарственное средство включают vcMMAE и mcMMAF конъюгаты антитело-лекарственное средство, как указано ниже, где p представляет собой нагрузку лекарственного средства, а Ab представляет собой антитело против PD-L1:



vcMMAE

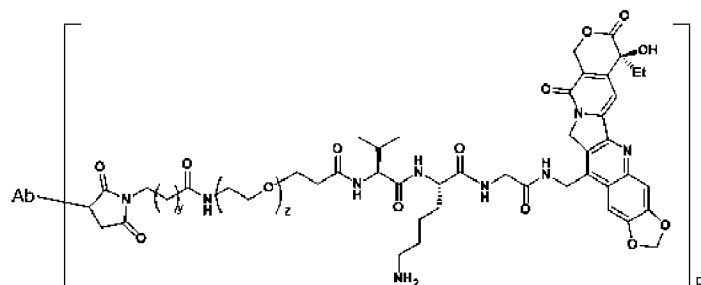


mcMMAF

или их фармацевтически приемлемую соль.

[0215] Примеры конъюгатов антитела против PD-L1 с лекарственным средством включают следующие конъюгаты антитела с камптотецином и лекарственным средством, где p представляет собой нагрузку лекарственного средства, а Ab представляет собой антитело против PD-L1:

[0216] В некоторых вариантах осуществления ADC камптотецина имеет формулу (IC):



(IC)

или его фармацевтически приемлемую соль;

где

Ab представляет собой антитело против PD-L1;

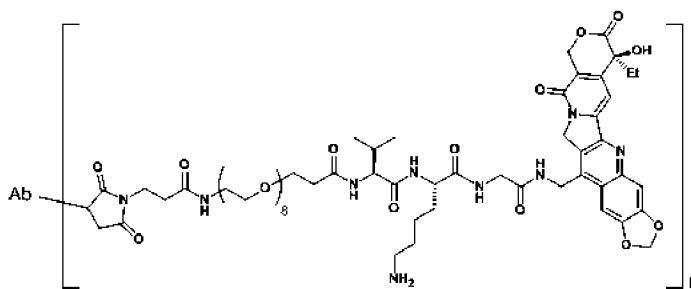
y равно 1, 2, 3 или 4 или равно 1 или 4; и

z представляет собой целое число от 2 до 12 или равно 2, 4, 8 или 12;

и p равно 1-16.

[0217] В некоторых аспектах этих вариантов осуществления p равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых аспектах p равно 2, 4 или 8.

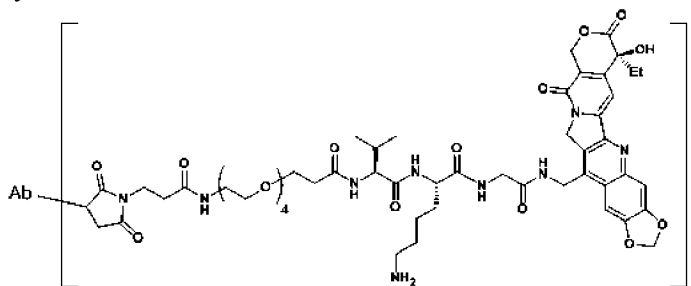
[0218] В некоторых вариантах осуществления ADC с камптотецином имеет формулу:



или его фармацевтически приемлемую соль;

где p равно 2, 4 или 8, предпочтительно p равно 8.

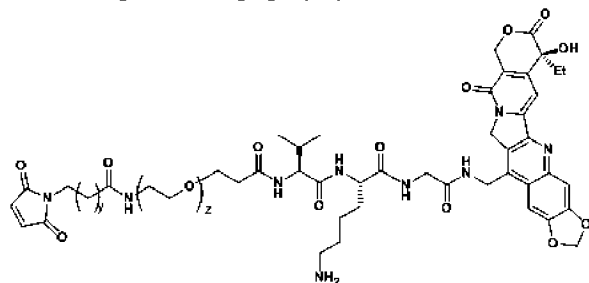
[0219] В некоторых вариантах осуществления ADC с камптотецином имеет формулу:



или его фармацевтически приемлемую соль;

где p равно 2, 4 или 8, предпочтительно p равно 8.

[0220] В некоторых вариантах осуществления камптотециновое лекарственное средство-линкер имеет формулу:



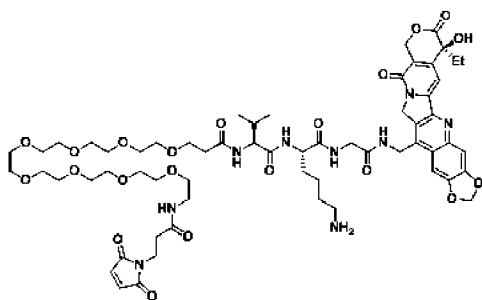
или его фармацевтически приемлемую соль;

где

u равно 1, 2, 3 или 4 или равно 1 или 4; и

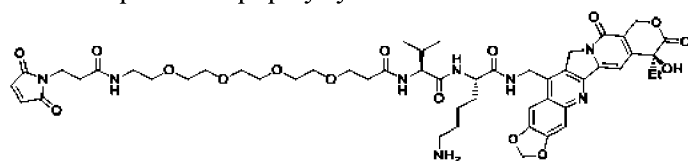
Z ПРЕДСТАВЛЯЕТ СОБОЙ ЦЕЛОЕ ЧИСЛО ОТ 2 ДО 12 ИЛИ РАВНО 2, 4, 8 ИЛИ 12.

[0221] В некоторых вариантах осуществления камптотециновое лекарственное средство-линкер имеет формулу:



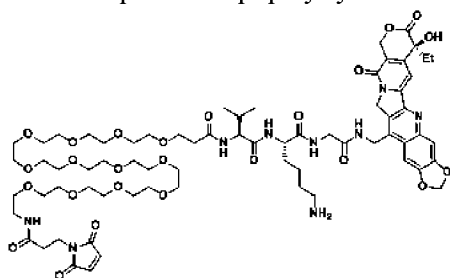
MP-PEG8-VKG-камптотецин

[0222] В некоторых вариантах осуществления камптотециновое лекарственное средство-линкер имеет формулу:



MP-PEG4-VKG-камптотецин

[0223] В некоторых вариантах осуществления камптотециновое лекарственное средство-линкер имеет формулу:



MP-PEG12-VKG-камптотецин

[0224] Что касается конъюгатов антитело-лекарственное средство, нацеленных на PD-L1, нижний индекс p представляет собой нагрузку лекарственного средства и, в зависимости от контекста, может представлять количество молекул лекарственного средство-линкер, присоединенных к отдельной молекуле антитела, и, как таковое, представляет собой целое число или может представлять среднюю нагрузку лекарственного средства и, как таковое, может быть целым или нецелым значением, но обычно является нецелым значением. Средняя нагрузка лекарственного средства представляет собой среднее число молекул лекарственного средства-линкера на одно антитело в популяции. Часто, но не всегда, когда мы говорим об антителе, например, моноклональном антителе, мы имеем в виду популяцию молекул антител. В композиции, содержащей популяцию молекул конъюгата антитело-лекарственное средство, средняя нагрузка лекарственного средства является важным атрибутом качества, поскольку она определяет количество лекарственного средства, которое может быть доставлено в клетку-мишень. Процент неконъюгированных молекул антител в композиции включен в среднее значение нагрузки лекарственного средства.

[0225] В предпочтительных аспектах настоящего изобретения средняя

лекарственная нагрузка применительно к композиции, содержащей совокупность соединений-конъюгатов антитело-лекарственное средство, составляет от 1 до примерно 16, предпочтительно от примерно 2 до примерно 14, больше предпочтительно от примерно 2 до примерно 10.

[0226] Для ADC MMAE и камптотецина, таких как приведенные в качестве примера в настоящем документе, предпочтительная средняя нагрузка лекарственного средства составляет примерно 2, 4 или 8, а особенно предпочтительная средняя нагрузка лекарственного средства составляет примерно 8. В одном варианте осуществления предпочтительная средняя лекарственная нагрузка для ADC MMAE составляет 2 или 4. В одном варианте осуществления предпочтительная средняя лекарственная нагрузка для ADC камптотецина составляет 4 или 8. В иллюстративных вариантах осуществления линкеры лекарственного средства конъюгированы с цистеиновыми остатками восстановленных межцепочечных дисульфидов. В некоторых аспектах фактическая нагрузка лекарственного средства для отдельных молекул антител в популяции соединений-конъюгатов антитело-лекарственное средство составляет от 1 до 10 (или от 6 до 10, или от 6 до 8) с преобладающей нагрузкой лекарственного средства, равной 8. Более высокая лекарственная нагрузка может быть достигнута, например, если в дополнение к межцепочечным дисульфидам лекарственное средство-линкер конъюгировать с введенными остатками цистеина (такими как остаток цистеина, введенный в положение 239, согласно индексу EU).

[0227] Часть ПЭГ (полиэтиленгликоля) линкера лекарственного средства может составлять от 2 до 36. Индекс z во всех приведенных выше вариантах осуществления предпочтительно составляет от 2 до 12, от 4 до 12, от 8 до 14, от 8 до 12, от 10 до 12 или от 10 до 14, больше предпочтительно от 2, 4, 8 или 12, и наиболее предпочтительно 8.

[0228] Полидисперсные ПЭГ, монодисперсные ПЭГ и дискретные ПЭГ могут быть использованы для получения конъюгатов пегилированного антитела с лекарственным средством по настоящему изобретению. Полидисперсные ПЭГ представляют собой гетерогенную смесь размеров и молекулярных масс, тогда как монодисперсные ПЭГ обычно очищают от гетерогенных смесей и, следовательно, обеспечивают одинаковую длину цепи и молекулярную массу. Предпочтительными единицами ПЭГ являются дискретные ПЭГ, соединения, которые синтезируются поэтапно, а не посредством процесса полимеризации. Дискретные ПЭГ представляют собой единую молекулу с определенной и конкретной длиной цепи. Как и в случае с нижним индексом « r », когда речь идет о популяциях конъюгатов антитело-лекарственное средство, значение нижнего индекса « n » может быть средним числом и может быть целым или нецелым числом.

[0229] Подходящие классы цитотоксических агентов для конъюгации с антителами против PD-L1 включают, например, антитубулиновые агенты, агенты, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ингибиторы репликации ДНК, химиотерапевтические сенсibilizаторы и т. п. Другие иллюстративные классы цитотоксических агентов включают антрациклины, ауристатины, камптотецины, дуокармицины, этопосиды,

майтансиноиды и алкалоиды барвинка. Некоторые типичные цитотоксические агенты включают ауристатины (например, ауристин Т, ауристин Е, АРР, монометилауристин F (ММАF), липофильный монометилауристин F, монометилауристин Е (ММАЕ)), вещества, связывающие малую бороздку ДНК (например, энедины и лекситропсины), дуокармицины, таксаны (например, паклитаксел и доцетаксел), алкалоиды барвинка, ингибитор никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPTi), тубулизин М, доксорубин, морфолино-доксорубин и цианоморфолино-доксорубин.

[0230] Цитотоксический агент может представлять собой химиотерапевтическое средство, такое как, например, доксорубин, паклитаксел, мелфалан, алкалоиды барвинка, метотрексат, митомицин С или этопосид. Агент также может представлять собой аналог СС-1065, калихимицин, мейтанзин, аналог доластатина 10, ризоксин или палитоксин.

[0231] Цитотоксический агент также может представлять собой ауристин. Ауристин может быть производным ауристина Е, например, сложным эфиром, образованным между ауристином Е и кетокислотой. Например, ауристин Е может вступать в реакцию с параацетилбензойной кислотой или бензоилвалериановой кислотой для получения АЕВ и АЕВВ, соответственно. Другие типичные ауристатины включают ауристин Т, АРР, ММАF и ММАЕ. Синтез и структура различных ауристинов описаны, например, в US 2005-0238649 и US 2006-0074008.

[0232] Цитотоксический агент может представлять собой агент, связывающийся с малой бороздкой ДНК. (См., например, Патент США № 6130237) Например, агент, связывающий малую бороздку, может представлять собой соединение СВІ или ендиин (например, калихеамицин).

[0233] Цитотоксический или цитостатический агент может представлять собой антибулиновый агент. Примеры антибулиновых агентов включают таксаны (например, Таксол® (паклитаксел), Таксотер® (доцетаксел)), Т67 (Туларик), алкалоиды барвинка (например, винкрестин, винбластин, виндезин и винорелбин) и ауристатины (например, ауристин Е, АРР, ММАF, ММАЕ, АЕВ, АЕВВ). Примеры ауристинов показаны ниже в формулах III-XIII. Другие подходящие антибулиновые агенты включают, например, производные баккатина, аналоги таксана (например, эпотилон А и В), нокодазол, колхицин и колчимид, эстрамустин, криптофизины, цемадотин, мейтансиноиды, комбретастатины, дискодермоид и элеутробин.

[0234] Цитотоксический агент может представлять собой мейтансиноид, другую группу антибулиновых агентов (например, DM1, DM2, DM3, DM4). Например, мейтансиноид может представлять собой мейтанзин или мейтанзин, содержащий лекарственный линкер, такой как DM-1 или DM-4 (ImmunoGen, Inc.; см. также Chari et al., 1992, Cancer Res.)

VIII. ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

[0235] Антитела по изобретению, сами по себе или в виде их конъюгатов антител

против PD-L1-лекарственное средство, можно использовать для лечения онкологических заболеваний. Некоторые такие виды онкологических заболеваний демонстрируют детектируемые уровни PD-L1, измеренные либо на уровне белка (например, с помощью иммунологического анализа с использованием одного из приведенных в качестве примера антител), либо на уровне мРНК. Некоторые такие виды онкологических заболеваний демонстрируют повышенный уровень PD-L1 по сравнению с нераковой тканью того же типа, предпочтительно от того же пациента. Иллюстративный уровень PD-L1 на опухолевых клетках, поддающихся лечению, составляет 5000-500000 молекул PD-L1 на клетку, хотя можно подвергать лечению больше высокие или больше низкие уровни. Необязательно уровень PD-L1 при онкологическом заболевании измеряют перед проведением лечения.

[0236] Примеры онкологических заболеваний, ассоциированных с экспрессией PD-L1 и поддающихся лечению, включают меланому, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), мелкоклеточный рак легкого (SCLC), рак головы и шеи, трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак яичников, уротелиальный рак, гепатоцеллюлярную карциному (HCC), рак желудка и рак шейки матки. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения меланомы. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения NSCLC. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения SCLC. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения рака головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения TNBC. Трижды негативный рак молочной железы - это термин, обозначающий рак, в котором отсутствуют определяемые рецепторы эстрогена и прогестерона и отсутствует избыточная экспрессия HER2/neu. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения рака яичников. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения уротелиального рака. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения HCC. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения рака желудка. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения рака шейки матки. Лечение может быть применено к пациентам с первичными или метастатическими опухолями этих видов. Лечение также может быть применено к пациентам, которые не поддаются обычному лечению или у которых возник рецидив после ответа на такое лечение.

[0237] Антитела по настоящему изобретению, такие как гуманизированные антитела, отдельно или в виде их конъюгатов, вводят по эффективной схеме, что означает дозу, способ введения и частоту введения, которые задерживают начало, уменьшают тяжесть, подавляют дальнейшее ухудшение и/или улучшает по меньшей мере один признак или симптом рака. Если пациент уже страдает онкологическим заболеванием, схему можно назвать терапевтически эффективной схемой. Если пациент подвержен повышенному риску рака по сравнению с общей популяцией, но еще не испытывает симптомов, схему можно назвать профилактически эффективной схемой. В некоторых случаях терапевтическую или профилактическую эффективность можно наблюдать у отдельного пациента по сравнению с историческим контролем или прошлым опытом у того же пациента. В других случаях терапевтическая или профилактическая эффективность может быть продемонстрирована в доклинических или клинических испытаниях в популяции пациентов, подвергшихся лечению, по сравнению с контрольной популяцией пациентов, не подвергавшихся лечению.

[0238] Иллюстративные дозы моноклонального антитела составляют от 0,1 мг/кг до 50 мг/кг массы тела пациента, чаще от 1 мг/кг до 30 мг/кг, от 1 мг/кг до 20 мг/кг, от 1 мг/кг до 15 мг/кг, от 1 мг/кг до 12 мг/кг, или от 1 мг/кг до 10 мг/кг 1, или от 2 мг/кг до 30 мг/кг, от 2 мг/кг до 20 мг/кг, от 2 мг/кг до 15 мг/кг, от 2 мг/кг до 12 мг/кг, или от 2 мг/кг до 10 мг/кг, или от 3 мг/кг до 30 мг/кг, от 3 мг/кг до 20 мг/кг, от 3 мг/кг до 15 мг/кг, от 3 мг/кг до 12 мг/кг или от 3 мг/кг до 10 мг/кг. Иллюстративные дозы моноклонального антитела или его конъюгатов антитело-лекарственное средство составляют от 1 мг/кг до 7,5 мг/кг, или от 2 мг/кг до 7,5 мг/кг, или от 3 мг/кг до 7,5 мг/кг массы тела пациента, или 0,1-20, или 0,5-5 мг/кг массы тела (например, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг) или 10-1500 или 200-1500 мг в качестве фиксированной дозировки. В некоторых способах пациенту вводят дозу по меньшей мере 1,5 мг/кг, по меньшей мере 2 мг/кг или по меньшей мере 3 мг/кг один раз в три недели или чаще. Дозировка зависит от частоты введения, состояния пациента и ответа на предшествующее лечение, если таковое имеется, от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим, а также от того, является ли расстройство острым или хроническим, среди других факторов.

[0239] Введение может быть парентеральным, внутривенным, пероральным, подкожным, внутриартериальным, внутрочерепным, подоболочечным, внутрибрюшинным, местным, интраназальным или внутримышечным. Введение также может быть локализовано непосредственно в опухоли. Введение в системный кровоток путем внутривенного или подкожного введения является предпочтительным. Внутривенное введение может осуществляться, например, путем инфузии в течение периода, такого как 30-90 мин, или путем однократной болюсной инъекции.

[0240] Частота введения зависит среди прочего от периода полужизни антитела или конъюгата в кровотоке, состояния пациента и пути введения. Частота может быть ежедневной, еженедельной, ежемесячной, ежеквартальной или с нерегулярными интервалами в ответ на изменения в состоянии пациента или прогрессирование

онкологического заболевания, подвергаемого лечению. Примерная частота внутривенного введения составляет от двух раз в неделю до ежеквартального введения в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможно больше или меньше частое введение доз. Другие иллюстративные частоты внутривенного введения составляют от одной недели до трех из каждых четырех недель в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможно больше или меньше частое введение доз. Для подкожного введения примерная частота дозирования составляет от ежедневного до ежемесячного введения, хотя также возможно больше или меньше частое дозирование.

[0241] Количество вводимых доз зависит от характера онкологического заболевания (например, наличия острых или хронических симптомов) и ответа заболевания на лечение. При острых заболеваниях или острых обострениях хронического заболевания часто бывает достаточно от 1 до 10 доз. Иногда при остром заболевании или остром обострении хронического заболевания бывает достаточно однократной болюсной дозы, необязательно в разделенной форме. Лечение можно повторить при рецидиве острого расстройства или при остром обострении. При хронических заболеваниях антитело можно вводить с регулярными интервалами, например, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально, каждые шесть месяцев в течение по меньшей мере 1, 5 или 10 лет или в течение всей жизни пациента.

[0242] Фармацевтические композиции для парентерального введения предпочтительно являются стерильными и по существу изотоническими и производятся в соответствии с требованиями GMP. Фармацевтические композиции могут быть предоставлены в виде стандартной лекарственной формы (т. е. дозировки для однократного введения). Фармацевтические композиции могут быть приготовлены с использованием одного или больше физиологически приемлемых носителей, разбавителей, вспомогательных веществ или добавок. Состав зависит от выбранного пути введения. Для инъекций антитела могут быть приготовлены в виде водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хенкса, раствор Рингера или физиологический раствор или ацетатный буфер (для уменьшения дискомфорта в месте инъекции). Раствор может содержать вспомогательные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. В качестве альтернативы антитела могут быть представлены в лиофилизированной форме для растворения перед применением с использованием подходящего носителя, например, стерильной апиrogenной воды. Концентрация антитела в жидком составе может составлять, например, 1-100 мг/мл, например 10 мг/мл.

[0243] Лечение антителами по изобретению можно комбинировать с химиотерапией, облучением, лечением стволовыми клетками, хирургическим вмешательством и другими видами лечения, эффективными в отношении расстройства, которое подвергают лечению. Полезные классы других агентов, которые можно вводить с антителами против PD-L1 и конъюгатами антитело против PD-L1-лекарственное средство, как описано в настоящем документе, включают, например, антитела к другим рецепторам,

экспрессированным на опухолевых клетках, антитубулиновые агенты (например, ауристатины), вещества, связывающие малую бороздку ДНК, ингибиторы репликации ДНК, алкилирующие агенты (например, комплексы платины, такие как цисплатин, моно(платина), бис(платина) и трехъядерные комплексы платины и карбоплатин), антрациклины, антибиотики, антифолаты, антиметаболиты, химиотерапевтические сенсibilizаторы, дуокармицины, этопосиды, фторированные пиримидины, ионофоры, лекситропсины, нитрозомочевины, платинолы, преформирующие соединения, пуриновые антиметаболиты, пуромицины, радиосенсibilizаторы, стероиды, таксаны, ингибиторы топоизомеразы, алкалоиды барвинка и т. п.

[0244] Лечение антителом против PD-L1 или конъюгатом антитело-лекарственное средство, необязательно в комбинации с любым из других средств или схем, описанных выше, отдельно или в виде конъюгата антитело-лекарственное средство, может увеличить медиану выживаемости без прогрессирования заболевания или общее время выживания пациентов с опухолями (например, меланома, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), мелкоклеточный рак легкого (SCLC), рак головы и шеи, трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак яичников, уротелиальный рак, гепатоцеллюлярная карцинома (HCC), рак желудка и рак шейки матки), особенно при рецидивах или рефрактерных формах, по меньшей мере на 30% или 40%, но предпочтительно на 50%, от 60% до 70% или даже на 100% или больше, по сравнению с тем же лечением (например, химиотерапией), но без антитела против PD-L1 отдельно или в виде конъюгата. В дополнение или в качестве альтернативы лечение (например, стандартная химиотерапия), включающее антитело против PD-L1 отдельно или в виде конъюгата, может повысить частоту полного ответа, частоту неполного ответа или объективную частоту ответа (полного+неполного) у пациентов с опухолями за счет по меньшей мере на 30% или 40%, но предпочтительно на 50%, от 60% до 70% или даже на 100% по сравнению с тем же лечением (например, химиотерапией), но без антитела против PD-L1 отдельно или в виде конъюгата.

[0245] Как правило, в клиническом исследовании (например, в фазе II, фазе II/III или фазе III) вышеупомянутое увеличение средней выживаемости без прогрессирования и/или частоты ответа у пациентов, получавших стандартную терапию плюс антитело против PD-L1 отдельно или в виде конъюгата по сравнению с контрольной группой пациентов, получающих только стандартную терапию (или плюс плацебо), являются статистически значимыми, например, на уровне $p=0,05$, или 0,01, или даже 0,001. Частота полного и частичного ответа определяется объективными критериями, обычно используемыми в клинических испытаниях онкологических заболеваний, например, как указано или принято Национальным институтом онкологических заболеваний и/или Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов.

IX. ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ ИЗДЕЛИЯ И НАБОРЫ

[0246] В другом аспекте предлагается изделие или набор, который содержит антитело против PD-L1 или конъюгат антитело против PD-L1-лекарственное средство,

описанные в настоящем документе. Изделие или набор могут дополнительно содержать инструкции по применению антитела против PD-L1 или конъюгата антитела против PD-L1-лекарственное средство, описанных в настоящем документе, в способах по изобретению. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изделие или набор содержат инструкции по применению антитела против PD-L1 или конъюгата антитела против PD-L1-лекарственное средство, описанных в настоящем документе, в способах лечения онкологического заболевания (например, меланомы, немелкоклеточного рака легких (NSCLC), мелкоклеточного рака легкого (SCLC), рака головы и шеи, трижды негативного рака молочной железы (TNBC), рака яичников, уротелиального рака, гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), рака желудка и рака шейки матки) у пациента, включающих введение пациенту эффективного количества антитела против PD-L1 или конъюгата антитела против PD-L1-лекарственное средство, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления пациентом является человек.

[0247] Изделие или набор могут дополнительно содержать контейнер. Подходящие контейнеры включают, например, пузырьки, флаконы (например, двухкамерные флаконы), шприцы (такие как однокамерные или двухкамерные шприцы) и пробирки. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой флакон. Контейнер может быть сделан из различных материалов таких как стекло или пластик. Контейнер содержит состав.

[0248] Изделие или набор могут дополнительно содержать этикетку или листок-вкладыш в упаковку, которые находятся на контейнере или связаны с ним, и которые могут содержать указания по восстановлению и/или применению препарата. На этикетке или листке-вкладыше может быть дополнительно указано, что препарат пригоден или предназначен для подкожного, внутривенного (например, внутривенной инфузии) или других способов введения для лечения онкологического заболевания у пациента (например, меланомы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), мелкоклеточного рака легкого (SCLC), рака головы и шеи, трижды негативного рака молочной железы (TNBC), рака яичников, уротелиального рака, гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), рака желудка и рака шейки матки). Контейнер, содержащий состав, может быть одноразовым или многоразовым флаконом, что позволяет повторно вводить восстановленный состав. Готовое изделие или набор могут дополнительно содержать второй контейнер, содержащий подходящий разбавитель. Изделие или набор могут дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой, терапевтической и пользовательской точек зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и листки-вкладыши в упаковки с инструкциями по применению.

[0249] Изделие или набор в настоящем документе необязательно дополнительно содержит контейнер, содержащий второе лекарственное средство, где антитело против PD-L1 или конъюгат антитела против PD-L1-лекарственное средство представляет собой первое лекарственное средство, и такое изделие или набор дополнительно содержит инструкции на этикетке или в листке-вкладыше в упаковку для лечения пациента вторым

лекарственным средством в эффективном количестве. В некоторых вариантах осуществления второе лекарственное средство предназначено для устранения или уменьшения тяжести одного или больше нежелательных явлений.

[0250] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-L1 или конъюгат антитело против PD-L1-лекарственное средство присутствует в контейнере в виде лиофилизированного порошка. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный порошок находится в герметично закрытой таре, такой как флакон, ампула или саше, с указанием количества активного агента. Если фармацевтическое средство вводят путем инъекции, ампула стерильной воды для инъекций или физиологического раствора может быть, например, предоставлена необязательно как часть набора, чтобы можно было смешать ингредиенты перед введением. Такие наборы могут дополнительно включать, при желании, один или больше различных обычных фармацевтических компонентов, таких как, например, контейнеры с одним или больше фармацевтически приемлемыми носителями, дополнительные контейнеры и т. д., как будет очевидно специалистам в данной области. В набор также могут быть включены печатные инструкции в виде листов-вкладышей или этикеток с указанием количества вводимых компонентов, рекомендации по применению и/или рекомендации по смешиванию компонентов.

ДРУГИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

[0251] Антитела против PD-L1, описанные в настоящем документе, такие как гуманизированные антитела против PD-L1, можно использовать для детектирования PD-L1 в контексте клинической диагностики или для лечения или в исследованиях. Экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках свидетельствует о том, что опухоль поддается лечению антителами по настоящему изобретению. Антитела также могут продаваться в качестве исследовательских реагентов для лабораторных исследований по обнаружению клеток, несущих PD-L1, и их реакции на различные раздражители. В таких случаях моноклональные антитела могут быть помечены флуоресцентными молекулами, спин-меченными молекулами, ферментами или радиоизотопами и могут поставляться в виде набора со всеми необходимыми реагентами для проведения анализа на PD-L1. Описанные в настоящем документе антитела можно использовать для детектирования экспрессии белка PD-L1 и определения того, поддается ли онкологическое заболевание лечению с помощью ADC PD-L1.

[0252] Все патентные заявки, веб-сайты, другие публикации, инвентарные номера и т. п., упомянутые выше или ниже, полностью включены в качестве ссылки для всех целей в той же степени, как если бы каждый отдельный элемент был конкретно и индивидуально указан как включенный в качестве ссылки. Если разные версии последовательности связаны с номером доступа в разное время, имеется в виду версия, связанная с номером доступа на дату вступления в силу настоящей заявки. Дата вступления в силу означает больше раннюю дату фактической подачи или дату подачи приоритетной заявки со ссылкой на номер доступа, если это применимо. Аналогичным

образом, если разные версии публикации, веб-сайта и т. п. публикуются в разное время, имеется в виду версия, опубликованная последней на дату подачи заявки, если не указано иное. Любой признак, стадия, элемент, вариант осуществления или аспект изобретения можно использовать в сочетании с любым другим, если специально не указано иное. Хотя настоящее изобретение было описано довольно подробно посредством иллюстрации и примеров для целей ясности и понимания, будет очевидно, что некоторые изменения и модификации могут быть осуществлены в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

[0253] Линии клеток, описанные в следующих примерах, поддерживали в культуре в соответствии с условиями, установленными Американской коллекцией типовых культур (ATCC) или Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Брауншвейг, Германия (DSMZ), или как известно другим образом.

Способы

Генерация антител

[0254] Антитела SG-559-xx, направленные против PD-L1, были получены путем введения точечных мутаций в CDR полностью человеческого Ab1 для снижения аффинности. Вкратце, остатки в CDR в непосредственной близости от эпитопа, связывающего PD-L1, были мутированы в отличающиеся аминокислоты. Четыре выбранных примера остатков показаны на Фигуре 1. В целях первоначального скрининга антитела SG-559-xx были получены в ATUM bio с использованием транзиторной трансфекции в клетках HEK293.

[0255] Для последующих исследований антитела были получены собственными силами в соответствии со следующим протоколом. Последовательности переменных и константных доменов антител синтезировали с использованием нематричной ПЦР. Вкратце, виртуальную последовательность гена преобразовывали в последовательности олигонуклеотидов с помощью инструмента биоинформатики Genewiz. Олигонуклеотиды синтезировали, объединяли и амплифицировали с помощью ПЦР. Полноразмерный ампликон из реакции ПЦР клонировали в вектор, а затем продукт трансформировали в *E. coli* и выделяли уникальные колонии. Колонии выращивали в течение ночи в жидких средах и плазмидную ДНК выделяли, очищали и подтверждали последовательность с помощью секвенирования по Сэнгеру. Легкие цепи и тяжелые цепи клонировали в векторы pcDNA3.4.

[0256] Векторы тяжелой и легкой цепей антитела в соотношении 1:1 разводили в среде ThermoFisher OptiPRO SFM с реагентом для трансфекции ExpiFectamine CHO. Реагент ДНК/трансфекции затем добавляли к культуре ExpiCHO в среде для экспрессии ThermoFisher ExpiCHO и культивировали в течение девяти дней с добавлением энхансера ExpiCHO в первый день и подпитки ExpiCHO в первый и второй дни. Культуру собирали центрифугированием и фильтрацией 0,2 мкм или глубинной фильтрацией с использованием контейнеров Millipore X0HC и D0HC с последующей фильтрацией 0,2

МКМ.

[0257] Для очистки каждого IgG использовали колонки GE HiTrap mAb Select SuRe. Перед элюированием смолу промывали 5CV PBS+0,1% Triton, 5CV PBS+0,5M NaCl и 7,5CV PBS. IgG элюировали с использованием буфера 100 мМ уксусной кислоты с pH3. В образце заменяли буфером с использованием колонок HiPrep Desalt 26/60 на PBS. Образец подвергали заключительной стадии полировки на колонке HiPrep Superdex 200 26/600 в PBS. Затем образец стерилизовали фильтрацией перед тем, как взять образец для характеристики. Характеризация включала определение концентрации при A280, ВЭЖХ aSEC, ВЭЖХ aHIC и восстановленную PLRP-MS (QToF).

Интерферометрия биослоя

[0258] Интерферометрию биослоя проводили с использованием системы Octet Red 384 (ForteBio) для определения аффинности связывания антител SG-559-xx. Биосенсоры с антителом против Fab-CH1 человека (FAB2G) (ForteBio) загружали в течение 100 с 4 мкг/мл антител SG-559-xx. После последующих базовых стадий человеческий PD-L1 (Acro Biosciences) в концентрациях в диапазоне от 500 нМ до 0,69 нМ (1x PBS pH 7,4 с 1% казеина, 0,2% Tween-20) инкубировали с загруженными зондами в течение 150 с для стадии ассоциации. Затем следовала стадия диссоциации в том же буфере без PD-L1 человека в течение 1000 с. кассоциации и кдиссоциации аппроксимировали к полученным кривым связывания в соответствии с установленными методами.

Получение конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC)

[0259] Антитела SG-559-xx конъюгировали с MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE со средним отношением лекарственного средства к антителу (DAR), равным 8, как описано в US 20180092984. Антитела SG-559-xx конъюгировали с vc-MMAE со средним значением DAR 4, как описано в US 20050238649. Антитела SG-559-xx конъюгировали с MP-PEG8-VKG-камптотецином со средним значением DAR, равным 8, как описано в PCT/US2019/025968 (подана 5 апреля 2019 г.).

Анализ цитотоксичности in vitro

[0260] Клеточные линии высевали за 24 часа до обработки конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC), чтобы позволить клеткам акклиматизироваться. Там, где указано, в это время также добавляли 500 МЕ/мл интерферона-γ для индуцирования экспрессии PD-L1. Затем клетки обрабатывали указанными дозами ADC и инкубировали в течение 96 часов при 37°C. Другие направленные против PD-L1 антитела, а также изотипические контроли были включены в качестве ADC для сравнения. Жизнеспособность клеток для клеточных линий измеряли с помощью CellTiter-Glo (Promega Corporation, Мэдисон, Висконсин) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре с реагентом CellTiter-Glo и измеряли люминесценцию с использованием планшет-ридера Envision (Perkin Elmer, Waltham, MA). Результаты представлены как x50, концентрация соединения, необходимая для снижения жизнеспособности клеток на 50% по сравнению с необработанными клетками.

Анализ интернализации

[0261] Интернализацию направленных против PD-L1 антител осуществляли с использованием чувствительных к pH конъюгатов FabFluor на Incucyte (Sartorius). Антитела конъюгировали с pH-чувствительным красителем, который имеет возрастающий флуоресцентный сигнал по мере снижения pH от клеточной поверхности и в эндосомные/лизосомные компартменты. Прикрепленные клетки высевали за 24 ч (с 500 ME/мл интерферона- γ для индукции экспрессии PD-L1) перед инкубацией с этими конъюгатами. Суспензионные клетки высевали за 3 ч до инкубации с этими конъюгатами. Затем клеткам давали 0,5 мкг/мл указанного конъюгата краситель-антитело и инкубировали в течение 48 часов. Используя программное обеспечение Incucyte S3 (Sartorius), общую интегральную интенсивность флуоресцентного сигнала нормализовали к проценту слияния на лунку в момент времени. Результаты представлены в виде площади под кривой зависимости нормализованной интегральной интенсивности от времени.

Исследование активности in vivo

[0262] Голым мышам подкожно инокулировали 5×10^6 клеток аденокарциномы поджелудочной железы BxPC3 или 1×10^6 клеток HMPJ EBC-1. Мышам NSG подкожно инокулировали 5×10^5 клеток MDA-MB-231 трижды негативного рака молочной железы. Мышам SCID инокулировали подкожно 1×10^6 клеток Karpas 299 ALCL или 1×10^6 клеток NSCLC Calu-1. Рост опухоли отслеживали с помощью штангенциркуля и рассчитывали средний объем опухоли по формуле ($0,5 \times [\text{длина} \times \text{ширина}^2]$). Когда средний объем опухоли достиг приблизительно 100 мм^3 , мышей не обрабатывали или проводили внутрибрюшинное введение, как указано для ADC. Неконъюгированные антитела и ADC vs-MMAE вводили еженедельно, всего три дозы. ADC MP-PEG8-VKG-камптотецин вводили только один раз. Мышей подвергали эвтаназии, когда объем опухоли достиг приблизительно 750 мм^3 . Для исследования иммунных характеристик у животных, несущих Karpas 299, средний объем опухоли позволял достигать 200 мм^3 . Этим мышам затем вводили однократную дозу неконъюгированного антитела или ADC и через шесть дней подвергали эвтаназии. Опухоли характеризовали *ex vivo* с помощью иммуногистохимии и анализа цитокинов (Luminex). Все процедуры на животных проводили в соответствии с протоколом, одобренным Институциональным комитетом по уходу и использованию животных в учреждении, аккредитованном Ассоциацией по оценке и аккредитации ухода за лабораторными животными.

Блокада PD-L1

[0263] Оценку блокады PD-L1 *in vitro* проводили с использованием биоанализа блокады PD-1/PD-L1 (Promega Corporation) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, PD-L1+клетки aAPC/CHO-K1 высевали и оставляли для акклиматизации в течение 16 часов. Затем к высеянными клеткам добавляли указанные концентрации антитела или ADC, после чего добавляли эффекторные PD-1+клетки. В отсутствие передачи сигналов PD-1/PD-L1 взаимодействие между клетками aAPC/CHO-K1 и эффекторными клетками приводит к биолуминесцентному сигналу. Следовательно,

больше эффективное ингибирование взаимодействия PD-1/PD-L1 приводит к больше высокому люминесцентному сигналу, количественно определяемому как кратность индукции по сравнению с необработанными клетками. Антитело, связывающее PD-1 (Promega Corporation), было включено в качестве положительного контроля, а несвязывающее изотипическое антитело было включено в качестве отрицательного контроля.

Иммунотоксичность в модели APC человека, стимулированной IFN γ для усиления PD-L1

[0264] Иммунотоксичность антител или ADC по отношению к антигенпрезентирующим клеткам человека *in vitro* измеряли с использованием антигенпрезентирующих клеток человека (APC), стимулированных интерфероном- γ (IFN γ), с последующей обработкой любым из описанных в настоящем документе антител или ADC. APC человека стимулировали *in vitro* с помощью IFN γ (R&D Systems) в дозе 500 ME/мл в течение 24 часов для усиления регуляции PD-L1 перед обработкой ADC SG-559-xx. Иммунотоксичность рассчитывали как процент жизнеспособности необработанных APC при различных концентрациях антител или ADC.

Ингибирование иммунного ответа в модели APC человека

[0265] Ингибирование иммунного ответа измеряли с использованием человеческих антигенпрезентирующих клеток (APC), стимулированных липополисахаридом (LPS), с последующей обработкой любым из описанных в настоящем документе антител или ADC. APC человека стимулировали *in vitro* с помощью IFN γ (R&D Systems) в дозе 500 ME/мл в течение 24 часов для усиления регуляции PD-L1. Затем APC человека обрабатывали ADC SG-559-xx, как указано, в течение 24 часов. Затем APC человека стимулировали *in vitro* LPS (Sigma Aldrich) в концентрации 100 нг/мл в течение 48 часов. Реакцию на LPS измеряли путем окрашивания проточной цитометрией MHC Class II и CD86 (Biolegend). Силу иммунной функции рассчитывали как кратное изменение MHC класса II или CD86 в ответ на стимуляцию LPS в APC при различных концентрациях антител или ADC.

Дегликозилирование PD-L1 человека с использованием PNGазы F

[0266] Для получения дегликозилированного hPD-L1 человеческий PD-L1 обрабатывали ферментом PNGаза F (New England Biolabs) в сочетании с протоколом денатурации. PNGаза F катализирует расщепление N-связанных олигосахаридов между самыми внутренними остатками GlcNAc и аспарагиновыми остатками высокоманнозных, гибридных и сложных олигосахаридов от N-связанных гликопротеинов. PD-L1 человека подвергали протоколу денатурации в отсутствие PNGазы F, чтобы обеспечить контроль реакции. Протокол дегликозилирования включал объединение PD-L1 человека (Acro Biosciences) с буфером Rapid PNGase F, нагревание PD-L1 человека при 75°C в течение 5 минут, охлаждение денатурированного PD-L1 человека на льду, добавление PNGase F и инкубацию при 37°C в течение ночи. Состояние гликозилирования подтверждали с помощью масс-спектрометрии.

[0267] Интерферометрию биослоя проводили с использованием системы Octet Red

384 (ForteBio) для определения аффинности связывания антител SG-559-xx или ADC с гликозилированным или дегликозилированным PD-L1. После последующих этапов определения исходного уровня гликозилированный PD-L1 человека и дегликозилированный PD-L1 человека в концентрациях от 500 нМ до 0,69 нМ (1x PBS pH 7,4 с 1% BSA, 0,2% Tween-20) инкубировали с загруженными зондами в течение 150 с для стадии ассоциации. Затем следовала стадия диссоциации в том же буфере без PD-L1 человека в течение 1000 с. кассоциации и кдиссоциации аппроксимировали к полученным кривым связывания в соответствии с установленными методами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пример 1: Дизайн и характеристика антител SG-559-xx

[0268] Семнадцать антител SG-559-xx были получены из родительского антитела Ab1, как описано в способах. CDR, содержащие мутации этих антител, обозначены в Таблице 1. Шестнадцать из этих антител оценивали на их моновалентную аффинность связывания с hPD-L1 с помощью биослойной интерферометрии по сравнению с Ab1 (Таблица 2). Измеренная аффинность антител SG-559-xx охватывает диапазон почти двух порядков со значениями K_D от 4 нМ до 297 нМ.

Таблица 1 SG-559-XX Варианты последовательностей

SG-559-xx ВАРИАНТ	МУТИРОВАННЫЕ CDR	SEQ ID No.
SG-559-01	HC CDR1	13
SG-559-02	LC CDR1	26
SG-559-03	LC CDR3	38
SG-559-04	HC CDR3	45
SG-559-05	HC CDR2	49
SG-559-06	HC CDR2	50
SG-559-07	HC CDR2	51
SG-559-08	HC CDR2	52
SG-559-09	HC CDR2	53
SG-559-10	HC CDR3	54
SG-559-11	HC CDR3	55
SG-559-12	LC CDR3	56
SG-559-13	LC CDR3	57
SG-559-14	LC CDR3	58
SG-559-15	LC CDR3	59
SG-559-16	LC CDR3	60
SG-559-17	LC CDR3	61

Таблица 2. Аффинность связывания SG-559-XX

АНТИТЕЛО	K_D (нМ)	k_{assoc} ($\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_{dissoc} ($\times 10^3 \text{ s}^{-1}$)
----------	------------	--	--

Ab1	2,7	5,5	1,5
SG-559-01	10	4,5	4,5
SG-559-02	33,3	4,2	14
SG-559-03	24,5	4,9	12
SG-559-04	25,6	3,9	10
SG-559-05	118,8	3,57	42,4
SG-559-06	79,9	3,13	25
SG-559-07	10	2,85	2,84
SG-559-08	66,6	3,29	21,9
SG-559-09	25,5	2,6	6,64
SG-559-10	287,8	4,1	118
SG-559-11	ND	ND	ND
SG-559-13	4,3	3,81	1,62
SG-559-14	8,9	3,99	3,55
SG-559-15	7,5	4,62	3,47
SG-559-16	24,7	3,86	9,53
SG-559-17	12,5	4,56	5,70

Пример 2: Цитотоксичность in vitro

[0269] Цитотоксичность антител SG-559-xx в качестве ADC оценивали, как описано в методах, в отношении линий опухолевых клеток, экспрессирующих PD-L1, включая 786-О, ВхРС3, ES-2, MDA-MB-231, Karpas 299 и L540cy. В некоторых экспериментах в качестве контроля использовали SU-DHL-4 (линия PD-L1-негативных опухолевых клеток). Первоначальный скрининг пятнадцати ADC SG-559-xx (не включая два с самой низкой аффинностью) с полезными нагрузками MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (DAR 8) показал, что некоторые антитела SG-559-xx демонстрируют значительно улучшенную цитотоксичность относительно родительского Ab1 (ФИГ. 2А-2F).

[0270] Четыре антитела SG-559-xx, которые постоянно демонстрировали наивысшую эффективность в начальном скрининге, были дополнительно охарактеризованы как ADC vc-MMAE и MP-PEG8-VKG-камптотецин (Таблица 3) по их эффективности. В большинстве протестированных клеточных линий эти ADC были значительно больше активными, чем Ab1. Они также не обладали активностью в антиген-отрицательной клеточной линии (SU-DHL-4), что позволяет предположить, что это не было связано с неспецифическим связыванием.

Таблица 3 SG-559-XX x50 Значения (нг/мл)

клеточная линия:	786-О	ВхРС3	MDA-MB-231	Karpas 299	L540cy	SU-DHL-4
Ab1 - vc-MMAE	>3000	642	308	43,2	>3000	>3000
SG-559-01 - vc-MMAE	>3000	23	45,6	2,56	24	>3000
SG-559-02 - vc-MMAE	>3000	19,1	26	4,44	26	>3000
SG-559-03 - vc-MMAE	>3000	16,4	22,9	4,14	20,9	>3000

MMAE						
SG-559-04 - vc-MMAE	>3000	17,3	24,3	3,42	33,1	>3000
Атезолизумаб - vc-MMAE	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000
Ab1 - MP-PEG8-VKG-Камтотецин	210	1680	102	2249	147	>3000
SG-559-01 - MP-PEG8-VKG-Камтотецин	468	54,7	13,8	3,05	3,51	>3000
SG-559-02 - MP-PEG8-VKG-Камтотецин	283	20,1	10,2	6,72	9,97	>3000
SG-559-03 - MP-PEG8-VKG-Камтотецин	1378	62,5	15,1	12,2	13,8	>3000
SG-559-04 - MP-PEG8-VKG-Камтотецин	190	23,3	7,89	5,95	10,7	>3000
Атезолизумаб - MP-PEG8-VKG-Камтотецин	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000

Пример 3: интернализация

[0271] Чтобы подтвердить результаты цитотоксичности, интернализацию SG-559-01 и SG-559-03 дополнительно исследовали с использованием системы визуализации Incucyte и конъюгатов pH-чувствительных красителей, как описано в методах. Интернализация SG-559-01 и SG-559-03 была постоянно выше в большинстве протестированных клеточных линий. Это измерялось процентным увеличением площади под кривой (AUC) нормализованной интегральной интенсивности с течением времени (Таблица 4). Примеры кривых показаны для MDA-MB-231 (Фиг. 3А) и Karpas 299 (Фиг. 3В).

Таблица 4 SG-559-XX Интернализация

	процент увеличения AUC относительно Ab1	
	SG-559-01	SG-559-03
786-O	44%	122%
A375	92%	97%
BxPC3	87%	149%
ES-2	11%	38%
MDA-MB-231	77%	140%
DEL	89%	152%
Karpas 299	109%	135%
L540cy	76%	81%

Пример 4: Противоопухолевая активность in vivo

[0272] Четыре антитела SG-559-xx, которые были охарактеризованы для скрининга

in vitro, также тестировали на противоопухолевую эффективность в двух моделях ксенотрансплантатов у мышей. В модели MDA-MB-231 антитела SG-559-xx в качестве ADC проявляли значительную противоопухолевую активность с двумя лекарственными средствами-линкерами (Фиг. 4А-4В). В модели ВхРС3 антитела SG-559-xx в качестве ADC проявляли умеренную противоопухолевую активность (Фиг. 5А-5В). Почти во всех случаях ADC SG-559-xx были больше эффективными, чем ADC Ab1, что позволяет предположить, что наблюдаемый *in vitro* фенотип транслируется в условия *in vivo*.

[0273] Противоопухолевую эффективность дополнительно наблюдали в дополнительных моделях с использованием одного из наших наиболее многообещающих антител в качестве варианта с уменьшенной эффекторной функцией Fc (SG-559-01 LALA). Антитело SG-559-01 LALA в качестве ADC проявляло значительную противоопухолевую активность с одним или двумя лекарственными средствами-линкерами в моделях с клетками Karpas 299 (Фиг. 6А-6В), Calu-1 (Фиг. 7) и EBC-1 (Фиг. 8А-8В). Обратите внимание, что эта активность отличается от активности неконъюгированного антитела SG-559-01 LALA.

Пример 5: Блокада PD-L1

[0274] SG-559-01 LALA был дополнительно охарактеризован своей способностью блокировать контрольную точку PD-1/PD-L1 *in vitro*. По сравнению с контрольным антителом PD-1, SG-559-01 способен больше эффективно ингибировать передачу сигналов PD-1/PD-L1. Кроме того, неконъюгированный LALA SG-559-01 был на одном уровне с LALA SG-559-01, конъюгированным с двумя лекарственными средствами-линкерами, демонстрируя, что конъюгация не влияет на блокирование PD-1/PD-L1 (ФИГ. 9).

Пример 6: Иммунотоксичность по отношению к APC человека *in vitro*

[0275] SG-559-01 и SG-559-01 LALA оценивали на иммунотоксичность по отношению к APC (например, макрофагам и дендритным клеткам (DC)). APC стимулировали IFN γ для усиления PD-L1 перед лечением, как описано в методах. SG-559-01 LALA ADC проявлял иммунотоксичность по отношению к APC человека, которая была аналогична или находилась в пределах одного порядка величины с изотипическими контролями как в макрофагах, так и в DC (ФИГ. 10А-10D).

[0276] Четыре антитела SG-559-xx, которые были охарактеризованы для скрининга *in vitro*, также тестировали на иммунотоксичность в отношении APC (т. е. дендритных клеток и макрофагов). Иммунотоксичность по отношению к APC человека была аналогична или находилась в пределах одного порядка для каждого из ADC SG-559-xx (ФИГ. 11А-11D).

Пример 7: Ингибирование иммунного ответа

[0277] ADC SG-559-01 дополнительно охарактеризовали путем измерения ингибирования иммунного ответа в APC человека, обработанных LPS. Как описано в способах, APC человека *in vitro* стимулировали LPS после обработки ADC, и последующую повышенную регуляцию МНС класса II и CD86 определяли количественно

как меру иммунного ответа. Обработка ADC SG-559-01 приводила к ингибированию иммунного ответа аналогичным образом или в пределах одного порядка величины изотипических контролей как в DC, так и в макрофагах, как измерено с помощью МНС класса II (ФИГ. 12А-12В) и CD86 (ФИГ. 12С-Д).

Пример 8: Усиление иммунной инфильтрации

[0278] SG-559-01 LALA vs-MMAE ADC дополнительно охарактеризовали путем оценки иммунной инфильтрации у мышей с опухолями Karpas 299. Мышей с опухолями обрабатывали, как указано, и опухоли охарактеризовывали через шесть дней. По сравнению как с необработанным контролем, так и с антителом SG-559-01, SG-559-01 vs-MMAE ADC индуцировал иммунную инфильтрацию у мышей с опухолями Karpas 299 (ФИГ. 13А-С). На ФИГ. 13А показано увеличение количества клеток mCD45+ (пан-лейкоцитарный маркер). На ФИГ. 13В показано увеличение количества клеток mCD11c+ (маркер для дендритных клеток и субпопуляции макрофагов). На ФИГ. 13С показано увеличение количества клеток mF4/80+ (маркер макрофагов).

Пример 9: Воспалительная реакция цитокинов

[0279] SG-559-01 LALA vs-MMAE ADC был дополнительно охарактеризован по его способности индуцировать продукцию воспалительных цитокинов в микроокружении опухоли (TME). По сравнению как с необработанным контролем, так и с антителом SG-559-01 LALA, SG-559-01 LALA vs-MMAE ADC индуцирует воспалительные цитокины в TME, что измеряется внутриопухолевыми концентрациями эотаксина (хемокин для эозинофилов; ФИГ. 14А), MIP1a. (провоспалительный цитокин макрофагов; ФИГ. 14В), MIP1b (провоспалительный цитокин макрофагов; ФИГ. 14С), MIG/CXCL9 (индуцируется IFN γ , влияет на миграцию и дифференцировку иммунных клеток; ФИГ. 14Д), MCP1 (хемокин для моноцитов/макрофагов; ФИГ. 14Е) и Rantes (хемокин для моноцитов, Т-клеток и эозинофилов; ФИГ. 14F).

Пример 10: Аффинность связывания с гликозилированным PD-L1 и дегликозилированным PD-L1

[0280] SG-559-01 оценивали на аффинность связывания с гликозилированной и дегликозилированной формами PD-L1. Аффинность связывания оценивали с помощью интерферометрии биослоя на системе Octet Red 384 (ForteBio), как описано в методах. Фермент PNGазы F и протокол денатурации использовали для дегликозилирования PD-L1, как описано в методах. SG-559-01 оценивали на аффинность связывания с дегликозилированным PD-L1 и контрольным гликозилированным PD-L1 (те же условия обработки, но без обработки PNGase F, как описано в методах). Наблюдали ~2-кратную разницу в аффинности связывания SG-559-01 с дегликозилированным PD-L1 по сравнению с гликозилированным PD-L1 (Таблица 5). Масс-спектрометрию использовали для проверки статуса гликозилирования PD-L1.

Таблица 5. SG-559-01 Связывание с гликозилированным и дегликозилированным hPD-L1

Образцы	Моновалентное связывание
---------	--------------------------

	K_D (нМ)	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{dis} (s^{-1})
Контроль hPD-L1	7	$1,1 \times 10^5$	$1,7 \times 10^{-3}$
Degly hPD-L1	15	$3,9 \times 10^5$	$2,7 \times 10^{-3}$

НЕОФИЦИАЛЬНЫЙ СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1 - Вариабельная область тяжелой цепи Ab1 - белок

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGDFTSTYAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GKAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO:2 - Вариабельная область легкой цепи Ab1 - белок

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISLPEPDAFVYYCQQRSNWPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:3 - CDR1 тяжелой цепи Ab1 - белок

TYAIS

SEQ ID NO:4 - CDR2 тяжелой цепи Ab1 - белок

GIPIFGKAHYAQKFQG

SEQ ID NO:5 - CDR3 тяжелой цепи Ab1 - белок

KFHFVSGSPFGMDV

SEQ ID NO:6 - CDR1 легкой цепи Ab1 - белок

RASQSVSSYLA

SEQ ID NO:7 - CDR2 легкой цепи Ab1 - белок

DASNRAT

SEQ ID NO:8 - CDR3 легкой цепи Ab1 - белок

QQRSNWPT

SEQ ID NO:9 - SG-559-01 LALA hIgG1, тяжелая цепь - белок

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGDFTSTAAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GKAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:10 - SG-559-01, легкая цепь каппа - белок

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISLPEPDAFVYYCQQRSNWPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:11 - SG-559-01 вариабельная область тяжелой цепи - белок

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGDFTSTAAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GKAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO:12 - SG-559-01, варибельная область легкой цепи - белок

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:13 - SG-559-01, CDR1 тяжелой цепи - белок

TAAIS

SEQ ID NO:14 - SG-559-01, CDR2 тяжелой цепи - белок

GIPIFGKAHYAQKFQG

SEQ ID NO:15 - SG-559-01, CDR3 тяжелой цепи - белок

KFHVSGSPFGMDV

SEQ ID NO:16 - SG-559-01, CDR1 легкой цепи - белок

RASQSVSSYLA

SEQ ID NO:17 - SG-559-01, CDR2 легкой цепи - белок

DASNRAT

SEQ ID NO:18 - SG-559-01, CDR3 легкой цепи - белок

QQRSNWPT

SEQ ID NO:19 - SG-559-02 LALA hIgG1, тяжелая цепь - белок

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGDFTSTYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GKAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARKFHVSGSPFGMDVW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:20 - SG-559-02, легкая цепь каппа - белок

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSALAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:21 - SG-559-02, варибельная область тяжелой цепи - белок

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGDFTSTYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GKAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARKFHVSGSPFGMDVW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO:22 - SG-559-02, варибельная область легкой цепи - белок

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSALAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:23 - SG-559-02 CDR1 тяжелой цепи - белок

TYAIS

SEQ ID NO:24 - SG-559-02 CDR2 тяжелой цепи - белок

GIPIFGKAHYAQKFQG

SEQ ID NO:25 - SG-559-02 CDR3 тяжелой цепи - белок

KFHFVSGSPFGMDV

SEQ ID NO:26 - SG-559-02 CDR1 легкой цепи - белок

RASQSVSSALA

SEQ ID NO:27 - SG-559-02 CDR2 легкой цепи - белок

DASNRAT

SEQ ID NO:28 - SG-559-02 CDR3 легкой цепи - белок

QQRSNWPT

SEQ ID NO:29 - SG-559-03 LALA hIgG1, тяжелая цепь - белок

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKTSGD TFSTY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GKAHYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:30 - SG-559-03, легкая цепь каппа - белок

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQRSNLPTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSS
TLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:31 - SG-559-03, переменная область тяжелой цепи - белок

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKTSGD TFSTY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GKAHYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO:32 - SG-559-03, переменная область легкой цепи - белок

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQRSNLPTFGQG TKVEIK

SEQ ID NO:33 - SG-559-03 CDR1 тяжелой цепи - белок

TYAIS

SEQ ID NO:34 - SG-559-03 CDR2 тяжелой цепи - белок

GIPIFGKAHYA QKFQG

SEQ ID NO:35 - SG-559-03 CDR3 тяжелой цепи - белок

KFHFVSGSPFGMDV

SEQ ID NO:36 - SG-559-03 CDR1 легкой цепи - белок

RASQSVSSYLA

SEQ ID NO:37 - SG-559-03 CDR2 легкой цепи - белок

DASNRAT

SEQ ID NO:38 - SG-559-03 CDR3 легкой цепи - белок

QQRSNLPT

SEQ ID NO:39 - SG-559-04 LALA hIgG1, тяжелая цепь - белок

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGDTFSTYAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GKAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARKFHFVSGSGFGMDVW
GQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:40 - SG-559-04, легкая цепь каппа - белок

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:41 - SG-559-04, переменная область тяжелой цепи - белок

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGDTFSTYAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GKAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARKFHFVSGSGFGMDVW
GQGTTTVTVSS

SEQ ID NO:42 - SG-559-04, переменная область легкой цепи - белок

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:43 - SG-559-04, CDR1 тяжелой цепи - белок

TYAIS

SEQ ID NO:44 - SG-559-04, CDR2 тяжелой цепи - белок

GIPIFGKAHYAQKFQG

SEQ ID NO:45 - SG-559-04, CDR3 тяжелой цепи - белок

KFHFVSGSGFGMDV

SEQ ID NO:46 - SG-559-04, CDR1 легкой цепи - белок

RASQSVSSYLA

SEQ ID NO:47 - SG-559-04, CDR2 легкой цепи - белок

DASNRAT

SEQ ID NO:48 - SG-559-04, CDR3 легкой цепи - белок

QQRSNWPT

SEQ ID NO:49 - SG-559-05, CDR2 тяжелой цепи - белок

GIPIAGKAHYAQKFQG

SEQ ID NO:50 - SG-559-06, CDR2 тяжелой цепи - белок

GIPIFGAAHYAQKFQG

SEQ ID NO:51 - SG-559-07, CDR2 тяжелой цепи - белок

GIPIFGRAHYAQKFQG

SEQ ID NO:52 - SG-559-08, CDR2 тяжелой цепи - белок

GIPIFGKAAAYAQKFQG

SEQ ID NO:53 - SG-559-09, CDR2 тяжелой цепи - белок

GIPIFGKAFYAQKFQG

SEQ ID NO:54 - SG-559-10, CDR3 тяжелой цепи - белок

KFHFVSGAPFGMDV

SEQ ID NO:55 - SG-559-11, CDR3 тяжелой цепи - белок

KFHFVSGSPAGMDV

SEQ ID NO:56 - SG-559-12, CDR3 легкой цепи - белок

QQASNWPT

SEQ ID NO:57 - SG-559-13, CDR3 легкой цепи - белок

QQKSNWPT

SEQ ID NO:58 - SG-559-14, CDR3 легкой цепи - белок

QQRSAWPT

SEQ ID NO:59 - SG-559-15, CDR3 легкой цепи - белок

QQRSQWPT

SEQ ID NO:60 - SG-559-16, CDR3 легкой цепи - белок

QQRSNAPT

SEQ ID NO:61 - SG-559-17, CDR3 легкой цепи - белок

QQRSNFPT

SEQ ID NO:62 - SG-559-01 hIgG1, тяжелая цепь - белок

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKTSGDTFSTAAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GKAHYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVW
GQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:63 - SG-559-02 hIgG1, тяжелая цепь - белок

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKTSGDTFSTY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GKAHYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVW
GQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:64 - SG-559-03 hIgG1, тяжелая цепь - белок

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKTSGDTFSTY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF

GKAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVW
 GQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:65 - SG-559-04 hIgG1, тяжелая цепь - белок

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGDFTSTYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
 GKAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARKFHFVSGSGFGMDVW
 GQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:66 - SG-559-01, варибельная область тяжелой цепи - нуклеиновая кислота

caggtccagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcggatgaaggtctcctgcaagacttctggagacac
 cttcagcacccgctatcagctgggtgcgacaggccctggacaagggcttgagtggatgggagggatcatccctatatttgtaaagca
 cactacgcacagaagtccagggcagagtcacgattaccgcggacgaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatc
 tgaggacacggcctgtattttgtgcgagaaagttcactttgttcggggagcccttcggatggacgtctggggccaagggaccacggt
 caccgtctctca

SEQ ID NO:67 - SG-559-01, варибельная область легкой цепи - нуклеиновая кислота

gaaattgtgttgacacagctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtg
 ttagcagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcaccaacaggggccactggcatccc
 gccaggtcagtggtgagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagttattactgtcagcag
 cgtagcaactggccgacgttcggccaagggaccaaggtggaatcaaa

SEQ ID NO:68 - SG-559-02, варибельная область тяжелой цепи - нуклеиновая кислота

caggtccagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcggatgaaggtctcctgcaagacttctggagacac
 cttcagcacctatgctatcagctgggtgcgacaggccctggacaagggcttgagtggatgggagggatcatccctatatttgtaaagcac
 actacgcacagaagtccagggcagagtcacgattaccgcggacgaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatct
 gaggacacggcctgtattttgtgcgagaaagttcactttgttcggggagcccttcggatggacgtctggggccaagggaccacggt
 caccgtctctca

SEQ ID NO:69 - SG-559-02, варибельная область легкой цепи - нуклеиновая кислота

gaaattgtgttgacacagctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtg
 ttagcagcgccttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcaccaacaggggccactggcatccc

agccaggttcagtggtcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcaactggccgacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

SEQ ID NO:70 - SG-559-03, варибельная область тяжелой цепи - нуклеиновая кислота

caggtccagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcgggaaggtctcctgcaagacttctggagacaccttcagcacctatgctatcagctgggtgcgacaggccccctggacaagggcttgagtggatgggagggatcatccctatatatttggtaaagcacactacgcacagaagttccagggcagagtcacgattaccgcggacgaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattttgtgcgagaaagtttcaatttgttcggggagccccctcgggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcaccgtctcctca

SEQ ID NO:71 - SG-559-03, варибельная область легкой цепи - нуклеиновая кислота

gaaattgtgtgacacagctctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgtagcagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcaccaacagggccactggcatccagccaggttcagtggtcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcaactgccgacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

SEQ ID NO:72 - SG-559-04, варибельная область тяжелой цепи - нуклеиновая кислота

caggtccagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcgggaaggtctcctgcaagacttctggagacaccttcagcacctatgctatcagctgggtgcgacaggccccctggacaagggcttgagtggatgggagggatcatccctatatatttggtaaagcacactacgcacagaagttccagggcagagtcacgattaccgcggacgaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattttgtgcgagaaagtttcaatttgttcggggagcggcttcgggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcaccgtctcctca

SEQ ID NO:73 - SG-559-04, варибельная область легкой цепи - нуклеиновая кислота

gaaattgtgtgacacagctctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgtagcagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcaccaacagggccactggcatccagccaggttcagtggtcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcaactggccgacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

SEQ ID NO:74 - SG-559-01 LALA hIgG1, тяжелая цепь - нуклеиновая кислота

caggtccagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcgggaaggtctcctgcaagacttctggagacaccttcagcacccgctatcagctgggtgcgacaggccccctggacaagggcttgagtggatgggagggatcatccctatatatttggtaaagcacactacgcacagaagttccagggcagagtcacgattaccgcggacgaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattttgtgcgagaaagtttcaatttgttcggggagccccctcgggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcagctagcaccaggggcccatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagctgcctgggttgctgtgtaaggactactccctgaacctgtgacagtgctctggaactcaggagccctgaccagcggcggtgcacaccttcccggctgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctgcccctcagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcaaaagcccgcaacaccaaggtggacaagaaagttgagccaaatcttgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagctgctgggggaccgtcagtttcttcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggagggtgcataatgcaagacaagccgcggggaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctc

caacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtttacacctgccccat
 cccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggcctcaagggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagc
 aatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgctgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggac
 aagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacagaagagcctctccctgt
 ctccgggcaaa

SEQ ID NO:75 - SG-559-01, легкая цепь каппа - нуклеиновая кислота

gaaattgtgtgacacagctccagccacctgtctttgtctccaggggaaagagccacctctcctgcagggccagtcagagtg
 ttagcagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatcatgatgcatccaacagggccactggcatcca
 gccaggtcagtggtgagtggtgtgggacagacttcaactcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcag
 cgtagcaactggccgacgttgcgcaagggaccaaggtggaaatcaaacgtacggctggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctg
 atgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaaggtggataacg
 cctccaatcgggtaactcccaggagagtgctacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgag
 caaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggg
 gagagtgt

SEQ ID NO:76 - SG-559-01 hIgG1, тяжелая цепь - нуклеиновая кислота

caggctccagctggtgcagctcggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcgggtgaaggtctcctgcaagacttctggagacac
 cttcagcacccgcgctatcagctgggtgcgacagggccctggacaagggcttgagtggatgggagggatcatccctatatttgtaaagca
 cactacgcacagaagttccagggcagagtcacgattaccgcggacgaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatc
 tgaggacacggcctgtattttgtgcgagaaagtttcaactttgttggggagccccctcggtatggacgtctggggccaagggaccacggt
 caccgtctctcagctagcaccaagggccccatctgttctccccctggcacccctcctccaagagcacctctgggggacagctgccctgggc
 tgcttggtcaaggactacttccctgaacctgtgacagtgtcctggaactcaggagccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcct
 acagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcac
 aagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtaaaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactc
 ctggggggaccgtcagttcttcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtgg
 acgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggga
 gcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctc
 caacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccca
 tcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggcctcaagggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag
 caatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgctgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtgga
 caagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacagaagagcctctccct
 gtctccgggcaaa

SEQ ID NO:77 - SG-559-02 LALA hIgG1, тяжелая цепь - нуклеиновая кислота

caggctccagctggtgcagctcggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcgggtgaaggtctcctgcaagacttctggagacac
 cttcagcacctatgctatcagctgggtgcgacagggccctggacaagggcttgagtggatgggagggatcatccctatatttgtaaagcac
 actacgcacagaagttccagggcagagtcacgattaccgcggacgaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatct
 gaggacacggcctgtattttgtgcgagaaagtttcaactttgttggggagccccctcggtatggacgtctggggccaagggaccacggt
 caccgtctctcagctagcaccaagggccccatctgttctccccctggcacccctcctccaagagcacctctgggggacagctgccctgggc
 tgcttggtcaaggactacttccctgaacctgtgacagtgtcctggaactcaggagccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcct
 acagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcac
 aagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtaaaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagct

gctgggggaccgtcagtccttcttcccccaaaacccaaggacacccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtgg
acgtgagccacgaagaccctgaggtcaagtcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggagga
gcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctc
caacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtttacacacctgccccat
cccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagc
aatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggac
aagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgaggctctgcacaaccactacacagaagagcctctccctgt
ctccgggcaaa

SEQ ID NO:78 - SG-559-02, легкая цепь каппа - нуклеиновая кислота

gaaattgtgtgacacagctccagccacccctgtcttctccaggggaaagagccacccctctcctgcagggccagtcagagt
ttagcagcgcttagcctggtaccaacagaacactggccaggtctccaggtctctcatatgatgatccaacagggccactggcatccc
agccaggttcagtggtggtctgggacagacttactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagca
gcgtgacaactggccgacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaactacggtggctgcaccatctgtcttctctccgccatct
gatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataac
gccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgtga
gcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacagg
ggagagtg

SEQ ID NO:79 - SG-559-02 hIgG1, тяжелая цепь - нуклеиновая кислота

caggtccagctggtgcagctcggggctgaggtgaagaagcctgggtctcgggtgaaggtctcctgcaagacttctggagacac
cttcagcacctatgctatcagctgggtgcgacaggccccctggacaagggcttgagtggatgggagggatcatccctatatttgtaaagcac
actacgcacagaagttccagggcagagtcacgattaccgcgacgaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatct
gaggacacggcctgtattttgtgcgagaaagtttactttgttccggggagccccctcggtatggacgtctggggccaagggaccacggt
caccgtctctcagctagcaccaagggccccatctgttctccccctggcaccctctccaagagcacctctgggggacagctgcctgggc
tgctggtcaaggactacttccctgaacctgtgacagtgtcctggaactcaggagccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcct
acagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcac
aagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactc
ctggggggaccgtcagtccttcttcccccaaaacccaaggacacccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtgg
acgtgagccacgaagaccctgaggtcaagtcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggagga
gcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctc
caacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccca
tcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag
caatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtgga
caagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctccct
gtctccgggcaaa

SEQ ID NO:80 - SG-559-03 LALA hIgG1, тяжелая цепь - нуклеиновая кислота

caggtccagctggtgcagctcggggctgaggtgaagaagcctgggtctcgggtgaaggtctcctgcaagacttctggagacac
cttcagcacctatgctatcagctgggtgcgacaggccccctggacaagggcttgagtggatgggagggatcatccctatatttgtaaagcac
actacgcacagaagttccagggcagagtcacgattaccgcgacgaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatct
gaggacacggcctgtattttgtgcgagaaagtttactttgttccggggagccccctcggtatggacgtctggggccaagggaccacggt
caccgtctctcagctagcaccaagggccccatctgttctccccctggcaccctctccaagagcacctctgggggacagctgcctgggc

tgcttggtcaaggactacttccctgaacctgtgacagtgtcctggaactcaggagccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcct
 acagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctgtccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcac
 aagcccgaacaccaaggtggacaagaaagttgagccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagct
 gctgggggaccgtcagtttcttcttccccccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtgg
 acgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggagga
 gcagtacaacagcacgtacctgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctc
 caaaaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtttacacctgccccat
 cccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggcctgcaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagc
 aatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctccctgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggac
 aagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacagaagagcctctccctgt
 ctccgggcaaa

SEQ ID NO:81 - SG-559-03, легкая цепь каппа - нуклеиновая кислота

gaaattgtgtgacacagctccagccacctgtcttgtctccaggggaaagagccacctctcctgcagggccagtcagagt
 ttagcagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcatcca
 gccaggtcagtggtcagtggtgtggtgacagacttcaactcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcag
 cgtagcaacctgccgacgttcggccaagggaaccaaggtggaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctga
 tgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgc
 cctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgtgagc
 aaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcggcgtcacaaagagcttcaacagggg
 agagtgt

SEQ ID NO:82 - SG-559-03 hIgG1, тяжелая цепь - нуклеиновая кислота

caggctcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcgtgaaggtctcctgcaagacttctggagacac
 cttagcacctatgctatcagctgggtgcgacagggccctggacaagggcttgagtggtgggagggatcatccctatatttgtaaagcac
 actacgcacagaagttccagggcagagtcacgattaccgcgacgaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatct
 gaggacacggcctgtattttgtgcgagaaagtttcaacttgtttcggggagccccctcggtatggacgtctggggccaagggaaccaggt
 caccgtctctcagctagcaccaggcccatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagctgcctgggc
 tgcttggtcaaggactacttccctgaacctgtgacagtgtcctggaactcaggagccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcct
 acagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctgtccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcac
 aagcccgaacaccaaggtggacaagaaagttgagccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactc
 ctggggggaccgtcagtttcttcttccccccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtgg
 acgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggagga
 gcagtacaacagcacgtacctgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctc
 caaaaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccca
 tcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggcctgcaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag
 caatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctccctgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtgga
 caagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacagaagagcctctccct
 gtctccgggcaaa

SEQ ID NO:83 - SG-559-04 LALA hIgG1, тяжелая цепь - нуклеиновая кислота

caggctcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcgtgaaggtctcctgcaagacttctggagacac
 cttagcacctatgctatcagctgggtgcgacagggccctggacaagggcttgagtggtgggagggatcatccctatatttgtaaagcac

actacgcacagaagttccagggcagagtcacgattaccgcgacgaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatct
gaggacacggccgtgtatTTTTgtgcgagaaagtttcaactttgtttcggggagcggcttcggtatggacgtctggggccaagggaccacgggt
caccgtctctcagctagcaccaagggcccatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagctgccttgggc
tgcttggtcaaggactacttccctgaacctgtgacagtgtcctggaactcaggagccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcct
acagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcac
aagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagct
gctgggggaccgtcagtcttcttcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctccggacccttgaggtcacatgctggtggtgg
acgtgagccacgaagacctgaggtcaagttaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggga
gcagtacaacagcacgtacctgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctc
caaaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtttacacctgccccat
ccccggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagc
aatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggac
aagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacagaagagcctctccctgt
ctccgggcaaa

SEQ ID NO:84 - SG-559-04, легкая цепь каппа - нуклеиновая кислота

gaaattgtttgacacagtctccagccacctgtctttgtctccaggggaaagagccacctctcctgcagggccagtcagagt
ttagcagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgatccaacaggggccactggcatcca
gccaggtcagtgccagtggtctgggacagacttcaactcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttactgtcagcag
cgtagcaactggccagcttccggccaagggaccaaggtggaatcaaacgtacgggtggtgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctg
atgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagtgataacg
ccctccaatcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgtgag
caaagcagactacgagaaacacaaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccgtcacaaagagcttcaacaggg
gagagtgt

SEQ ID NO:85 - SG-559-04 hIgG1, тяжелая цепь - нуклеиновая кислота

caggctcagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcgggtgaaggtctcctgcaagacttctggagacac
cttcagcacctatgctatcagctgggtgcgacaggccccctggacaagggccttgagtggatgggagggatcatccctatatttgtaaagcac
actacgcacagaagttccagggcagagtcacgattaccgcgacgaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatct
gaggacacggccgtgtatTTTTgtgcgagaaagtttcaactttgtttcggggagcggcttcggtatggacgtctggggccaagggaccacgggt
caccgtctctcagctagcaccaagggcccatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagctgccttgggc
tgcttggtcaaggactacttccctgaacctgtgacagtgtcctggaactcaggagccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcct
acagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcac
aagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactc
ctggggggaccgtcagtcttcttcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctccggacccttgaggtcacatgctggtggtgg
acgtgagccacgaagacctgaggtcaagttaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggga
gcagtacaacagcacgtacctgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctc
caaaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccca
tcccggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag
caatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtgga
caagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacagaagagcctctccct
gtctccgggcaaa

SEQ ID NO:86 - Ab1 hIgG1, тяжелая цепь - белок

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKTSGDTFSTY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GKAHYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVW
GQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:87 - Ab1 легкая цепь каппа - белок

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с человеческим белком лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1), где антитело демонстрирует аффинность связывания с человеческим белком PD-L1, которая составляет от 3 до 300 нМ.

2. Антитело по п. 1, где антитело демонстрирует аффинность связывания с человеческим белком PD-L1, которая составляет от 3 до 15 нМ.

3. Антитело по п. 1 или п. 2, где антитело дополнительно демонстрирует более высокую общую интернализацию, чем общая интернализация Ab1.

4. Антитело по п. 3, где общая интернализация представляет собой увеличение AUC от 9% до 155% относительно AUC Ab1.

5. Антитело по п. 3, где общую интернализацию определяют с помощью анализа интернализации FabFluor.

6. Антитело по любому из пп. 1-5, где антитело дополнительно демонстрирует значение x_{50} , которое ниже, чем значение x_{50} Ab1.

7. Антитело по п. 6, где антитело конъюгировано с монометилауристатином E (MMAE), и где x_{50} составляет от 3 нг/мл до 20 нг/мл в клеточной линии MDA-MB-231.

8. Антитело по п. 6, где антитело конъюгировано с камптотецином, и где x_{50} составляет от 15 нг/мл до 55 нг/мл в клеточной линии MDA-MB-231.

9. Антитело по любому из пп. 1-8, где антитело содержит последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 13-15 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 16-18.

10. Антитело по любому из пп. 1-8, где антитело содержит последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 3-5 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 6-8, где антитело содержит одну или больше аминокислотных замен в пределах одной или больше CDR.

11. Антитело по любому из пп. 1-10, где антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12.

12. Антитело по любому из пп. 1-11, где антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12.

13. Антитело по любому из пп. 1-12, где антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:

12.

14. Антитело по любому из пп. 1-13, где антитело содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 11 и последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 12.

15. Антитело по любому из пп. 1-14, где антитело содержит легкую цепь SEQ ID NO: 9 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 10.

16. Антитело по любому из пп. 1-15, где фрагмент представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH, Fv, диатело, линейное антитело или фрагмент одноцепочечного антитела.

17. Антитело по любому из пп. 1-16, где антитело содержит мутации L234A и L235A в тяжелой цепи антитела.

18. Антитело по любому из пп. 1-17, где константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG1.

19. Антитело по любому из пп. 1-18, где антитело представляет собой гуманизированное или химерное антитело.

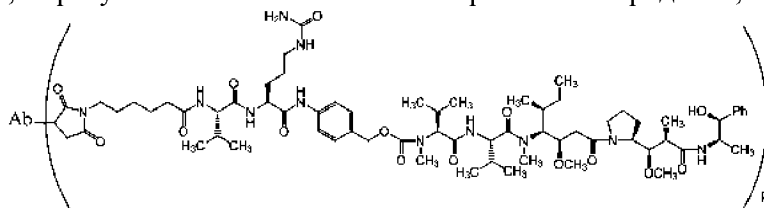
20. Антитело по любому из пп. 1-19, где антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом через линкер.

21. Антитело по п. 20, где антитело конъюгировано с монометилауристатином E (MMAE).

22. Антитело по п. 21, где антитело конъюгировано с MMAE через расщепляемую ферментом линкерную единицу.

23. Антитело по п. 22, где расщепляемая ферментом линкерная единица содержит линкер Val-Cit.

24. Антитело по любому из пп. 20-23, где антитело конъюгировано с MMAE через линкер, образуя конъюгат антитело-лекарственное средство, имеющий структуру:



где Ab представляет собой

антитело, и p находится в диапазоне от 2 до 10.

25. Антитело по п. 24, где p равно 4.

26. Антитело по п. 24, где p равно 8.

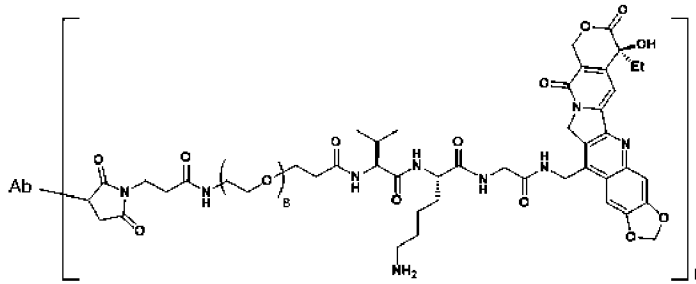
27. Антитело по п. 20, где антитело конъюгировано с камптотецином.

28. Антитело по п. 27, где антитело конъюгировано с камптотецином через расщепляемую ферментом линкерную единицу.

29. Антитело по п. 28, где расщепляемая ферментом линкерная единица содержит линкер Val-Lys-Gly.

30. Антитело по любому из пп. 27-29, где антитело конъюгировано с камптотецином через линкер, образуя конъюгат антитело-лекарственное средство,

имеющий структуру:



где Ab представляет собой антитело, и p находится в диапазоне от 2 до 10.

31. Антитело по п. 30, где p равно 4.

32. Антитело по п. 30, где p равно 8.

33. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество антитела по любому из пп. 1-32 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

34. Способ лечения онкологического заболевания у пациента, включающий введение пациенту антитела по любому из пп. 1-33.

35. Способ по п. 34, где пациентом является человек.

36. Способ по п. 34 или п. 35, где онкологическое заболевание представляет собой меланому, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), мелкоклеточный рак легкого (SCLC), рак головы и шеи, трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак яичников, уротелиальный рак, гепатоцеллюлярную карциному (HCC), рак желудка или рак шейки матки.

37. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп. 1-33.

38. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 37.

39. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 38.

40. Клетка-хозяин по п. 39, где клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO).

41. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с человеческим белком PD-L1, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 39 или 40 в условиях, подходящих для получения антитела.

42. Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство, который специфически связывается с человеческим белком PD-L1, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 39 или 40 в условиях, подходящих для получения антитела; и конъюгацию антитела с цитотоксическим агентом.

43. Способ по п. 42, где цитотоксический агент представляет собой MMAE или камптотecin.

44. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с человеческим белком PD-L1, где антитело содержит последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 3-5 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 6-8, где антитело содержит одну или больше аминокислотных замен в одной или больше CDR.

45. Антитело по п. 44, где антитело демонстрирует аффинность связывания с человеческим белком PD-L1, которая составляет от 3 до 300 нМ.

46. Антитело по п. 44 или 45, где антитело демонстрирует аффинность связывания с человеческим белком PD-L1, которая составляет от 3 до 15 нМ.

47. Антитело по любому из пп. 44-46, где антитело дополнительно демонстрирует более высокую общую интернализацию, чем общая интернализация Ab1.

48. Антитело по п. 47, где общая интернализация представляет собой увеличение AUC от 9% до 155% относительно AUC Ab1.

49. Антитело по п. 48, где общую интернализацию определяют с помощью анализа интернализации FabFluor.

50. Антитело по любому из пп. 44-49, где антитело дополнительно демонстрирует x50, которая выше чем x50 Ab1.

51. Антитело по п. 50, где антитело конъюгировано с монометилауристатином E (MMAE), и где x50 составляет от 3 нг/мл до 20 нг/мл в клеточной линии MDA-MB-231.

52. Антитело по п. 50, где антитело конъюгировано с камптотецином, и где x50 составляет от 15 нг/мл до 55 нг/мл в клеточной линии MDA-MB-231.

53. Антитело по любому из пп. 44-52, где антитело содержит последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 13-15 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 16-18.

54. Антитело по любому из пп. 44-53, где антитело содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и последовательность варибельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12.

55. Антитело по любому из пп. 44-54, где антитело содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и последовательность варибельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12.

56. Антитело по любому из пп. 44-55, где антитело содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и последовательность варибельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12.

57. Антитело по любому из пп. 44-56, где антитело содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 11 и последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 12.

58. Антитело по любому из пп. 44-57, где антитело содержит легкую цепь SEQ ID NO: 9 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 10.

59. Антитело по любому из пп. 44-58, где фрагмент представляет собой Fab, Fab',

F(ab')₂, Fab'-SH, Fv, диатело, линейное антитело или фрагмент одноцепочечного антитела.

60. Антитело по любому из пп. 44-59, где антитело содержит мутации L234A и L235A в тяжелой цепи антитела.

61. Антитело по любому из пп. 44-60, где константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG1.

62. Антитело по любому из пп. 44-61, где антитело представляет собой гуманизированное или химерное антитело.

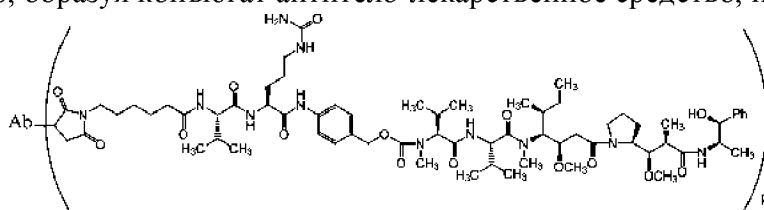
63. Антитело по любому из пп. 44-62, где антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом через линкер.

64. Антитело по п. 63, где антитело конъюгировано с монометилауристатином E (MMAE).

65. Антитело по п. 64, где антитело конъюгировано с MMAE через расщепляемую ферментом линкерную единицу.

66. Антитело по п. 65, где расщепляемая ферментом линкерная единица содержит линкер Val-Cit.

67. Антитело по любому из пп. 63-66, где антитело конъюгировано с MMAE через линкер, образуя конъюгат антитело-лекарственное средство, имеющий структуру:



где Ab представляет собой антитело, и p находится в диапазоне от 2 до 10.

68. Антитело по п. 67, где p равно 4.

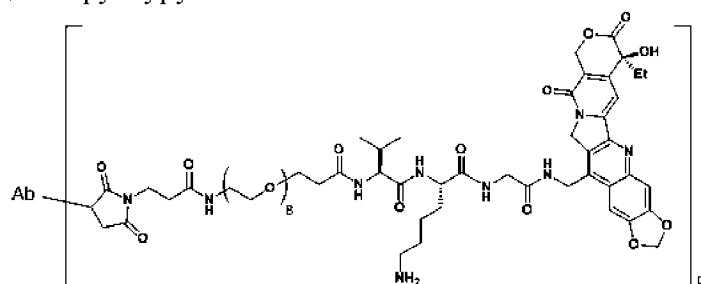
69. Антитело по п. 67, где p равно 8.

70. Антитело по п. 63, где антитело конъюгировано с камптотецином.

71. Антитело по п. 70, где антитело конъюгировано с камптотецином через расщепляемую ферментом линкерную единицу.

72. Антитело по п. 71, где расщепляемая ферментом линкерная единица содержит линкер Val-Lys-Gly.

73. Антитело по любому из пп. 70-72, где антитело конъюгировано с камптотецином через линкер, образуя конъюгат антитело-лекарственное средство, имеющий структуру:



где Ab представляет собой антитело, и p находится в диапазоне от 2 до 10.

74. Антитело по п. 73, где p равно 4.

75. Антитело по п. 73, где p равно 8.

76. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество антитела по любому из пп. 44-75 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

77. Способ лечения онкологического заболевания у пациента, включающий введение пациенту антитела по любому из пп. 44-76.

78. Способ по п. 77, где пациентом является человек.

79. Способ по п. 77 или п. 78, где онкологическое заболевание представляет собой меланому, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), мелкоклеточный рак легкого (SCLC), рак головы и шеи, трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак яичников, уротелиальный рак, гепатоцеллюлярную карциному (HCC), рак желудка или рак шейки матки.

80. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп. 44-76.

81. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 80.

82. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 81.

83. Клетка-хозяин по п. 82, где клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO).

84. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с человеческим белком PD-L1, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 82 или 83 в условиях, подходящих для получения антитела.

85. Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство, который специфически связывается с человеческим белком PD-L1, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 82 или 83 в условиях, подходящих для получения антитела; и конъюгацию антитела с цитотоксическим агентом.

86. Способ по п. 85, где цитотоксический агент представляет собой MMAE или камптотецин.

87. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с человеческим белком PD-L1, где антитело содержит последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 13-15 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 16-18.

88. Антитело по п. 87, где антитело демонстрирует аффинность связывания с человеческим белком PD-L1, которая составляет от 3 до 300 нМ.

89. Антитело по п. 87 или 88, где антитело демонстрирует аффинность связывания с человеческим белком PD-L1, которая составляет от 3 до 15 нМ.

90. Антитело по любому из пп. 87-89, где антитело дополнительно демонстрирует более высокую общую интернализацию, чем общая интернализация Ab1.

91. Антитело по п. 90, где общая интернализация представляет собой увеличение AUC от 9% до 155% относительно AUC Ab1.

92. Антитело по п. 91, где общую интернализацию определяют с помощью анализа интернализации FabFluor.

93. Антитело по любому из пп. 87-92, где антитело дополнительно демонстрирует x50, которая выше, чем x50 Ab1.

94. Антитело по п. 93, где антитело конъюгировано с монометилауристатином E (MMAE), и где x50 составляет от 3 нг/мл до 20 нг/мл в клеточной линии MDA-MB-231.

95. Антитело по п. 93, где антитело конъюгировано с камптотецином, и где x50 составляет от 15 нг/мл до 55 нг/мл в клеточной линии MDA-MB-231.

96. Антитело по любому из пп. 87-95, где антитело содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и последовательность варибельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12.

97. Антитело по любому из пп. 87-96, где антитело содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и последовательность варибельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12.

98. Антитело по любому из пп. 87-97, где антитело содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и последовательность варибельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12.

99. Антитело по любому из пп. 87-98, где антитело содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 11 и последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 12.

100. Антитело по любому из пп. 87-99, где антитело содержит легкую цепь SEQ ID NO: 9 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 10.

101. Антитело по любому из пп. 87-100, где фрагмент представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH, Fv, диатело, линейное антитело или фрагмент одноцепочечного антитела.

102. Антитело по любому из пп. 87-101, где антитело содержит мутации L234A и L235A в тяжелой цепи антитела.

103. Антитело по любому из пп. 87-102, где константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG1.

104. Антитело по любому из пп. 87-103, где антитело представляет собой гуманизированное или химерное антитело.

105. Антитело по любому из пп. 87-104, где антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом через линкер.

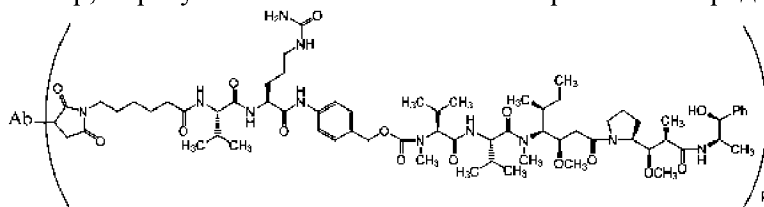
106. Антитело по п. 105, где антитело конъюгировано с монометилауристатином E

(MMAE).

107. Антитело по п. 106, где антитело конъюгировано с MMAE через расщепляемую ферментом линкерную единицу.

108. Антитело по п. 107, где расщепляемая ферментом линкерная единица содержит линкер Val-Cit.

109. Антитело по любому из пп. 105-108, где антитело конъюгировано с MMAE через линкер, образуя конъюгат антитело-лекарственное средство, имеющий структуру:



где Ab представляет собой антитело, и p находится в диапазоне от 2 до 10.

110. Антитело по п. 109, где p равно 4.

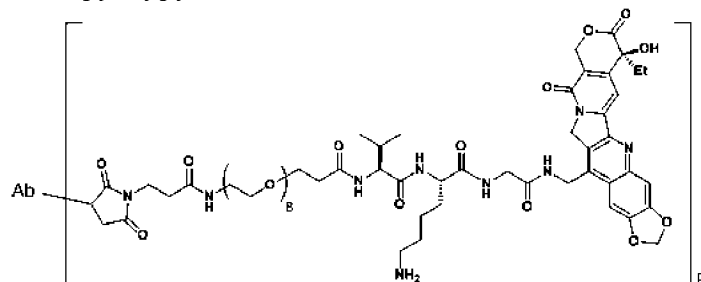
111. Антитело по п. 109, где p равно 8.

112. Антитело по п. 105, где антитело конъюгировано с камптотецином.

113. Антитело по п. 112, где антитело конъюгировано с камптотецином посредством расщепляемой ферментом линкерной единицы.

114. Антитело по п. 113, где расщепляемая ферментом линкерная единица содержит линкер Val-Lys-Gly.

115. Антитело по любому из пп. 112-114, где антитело конъюгировано с камптотецином через линкер, образуя конъюгат антитело-лекарственное средство, имеющий структуру:



где Ab представляет собой антитело, и p находится в диапазоне от 2 до 10.

116. Антитело по п. 115, где p равно 4.

117. Антитело по п. 115, где p равно 8.

118. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество антитела по любому из пп. 87-117 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

119. Способ лечения онкологического заболевания у пациента, включающий введение пациенту антитела по любому из пп. 87-118.

120. Способ по п. 119, где пациентом является человек.

121. Способ по п. 119 или 120, где онкологическое заболевание представляет собой меланому, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), мелкоклеточный рак легкого (SCLC),

рак головы и шеи, трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак яичников, уротелиальный рак, гепатоцеллюлярную карциному (HCC), рак желудка или рак шейки матки.

122. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп. 87-118.

123. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 122.

124. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 123.

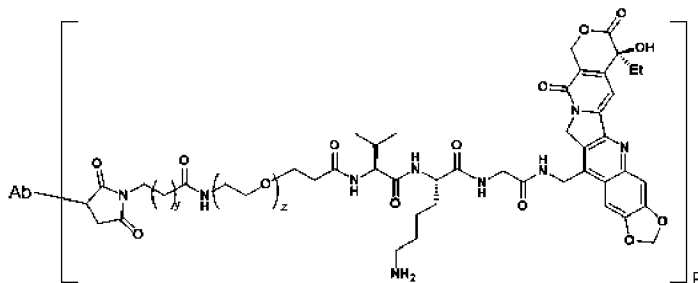
125. Клетка-хозяин по п. 124, где клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO).

126. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с человеческим белком PD-L1, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 124 или 125 в условиях, подходящих для получения антитела.

127. Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство, который специфически связывается с человеческим белком PD-L1, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 124 или 125 в условиях, подходящих для получения антитела; и конъюгацию антитела с цитотоксическим агентом.

128. Способ по п. 127, где цитотоксический агент представляет собой MMAE или камптотecin.

129. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с человеческим белком PD-L1, где антитело конъюгировано с камптотечином, образуя конъюгат антитело-лекарственное средство, где конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру:



где

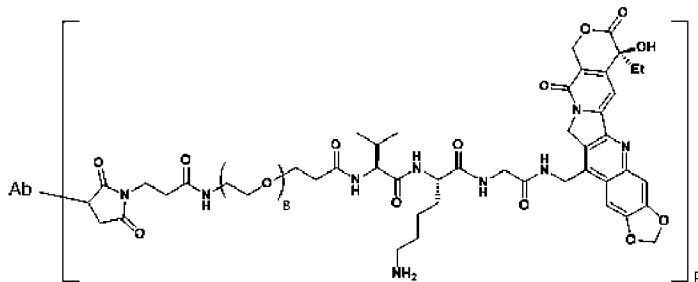
Ab представляет собой антитело против PD-L1;

у равно 1, 2, 3 или 4 или равно 1 или 4; и

z представляет собой целое число от 2 до 12 или равно 2, 4, 8 или 12;

и p равно 1-16.

130. Антитело по п. 129, где конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру:



131. Антитело по п. 129 или 130, где p находится в диапазоне от 2 до 10.

132. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с человеческим белком лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1), где антитело демонстрирует аффинность связывания с человеческим белком PD-L1, которая больше, чем у Ab1.

133. Антитело по п. 132, где антитело демонстрирует аффинность связывания, которая больше чем 2,7 нМ.

134. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с человеческим белком лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1), где антитело демонстрирует k_{assoc} для человеческого белка PD-L1, которая меньше чем для Ab1.

135. Антитело по п. 134, где антитело имеет k_{assoc} для человеческого белка PD-L1, которая составляет меньше чем $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

136. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с человеческим белком лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1), где антитело демонстрирует K_{Dissoc} для человеческого белка PD-L1, которая больше чем для Ab1.

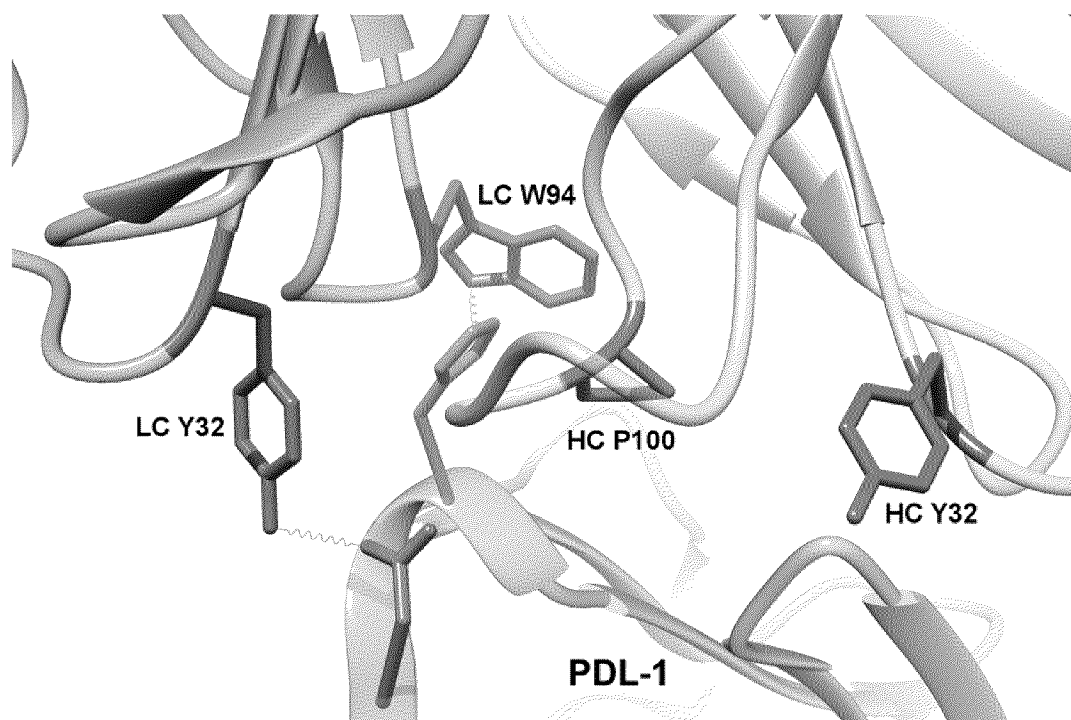
137. Антитело по п. 136, где антитело демонстрирует K_{Dissoc} для человеческого белка PD-L1, которая больше чем $2 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$.

138. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с человеческим белком PD-L1, где антитело содержит последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 3-5 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 6-8, где антитело содержит одну или больше аминокислотных замен в одной или больше CDR, и где антитело демонстрирует аффинность связывания с человеческим белком PD-L1, которая находится в диапазоне от 5 нМ до 15 нМ, и где антитело конъюгировано с MMAE.

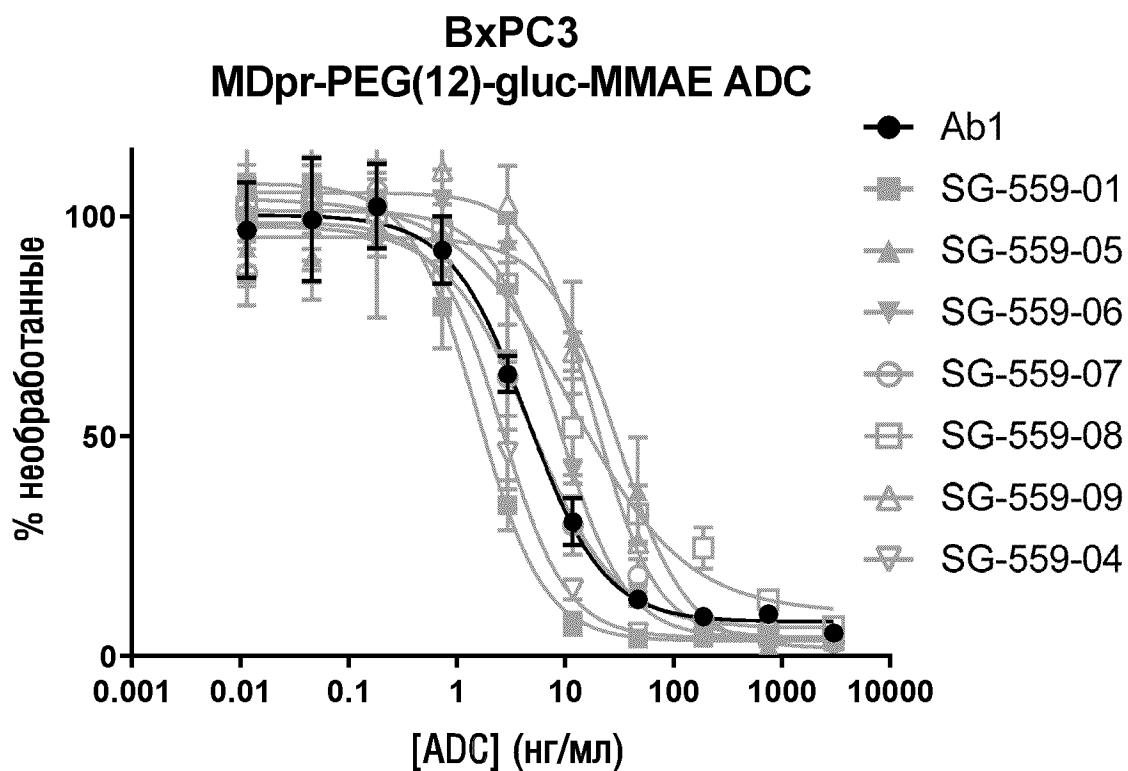
139. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с человеческим белком PD-L1, где антитело содержит последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 3-5 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 6-8, где антитело содержит одну или больше аминокислотных замен в одной или больше CDR, и где антитело демонстрирует аффинность связывания с человеческим белком PD-L1, которая находится в диапазоне от 5 нМ до 15 нМ, и где антитело конъюгировано с камптотецином.

По доверенности

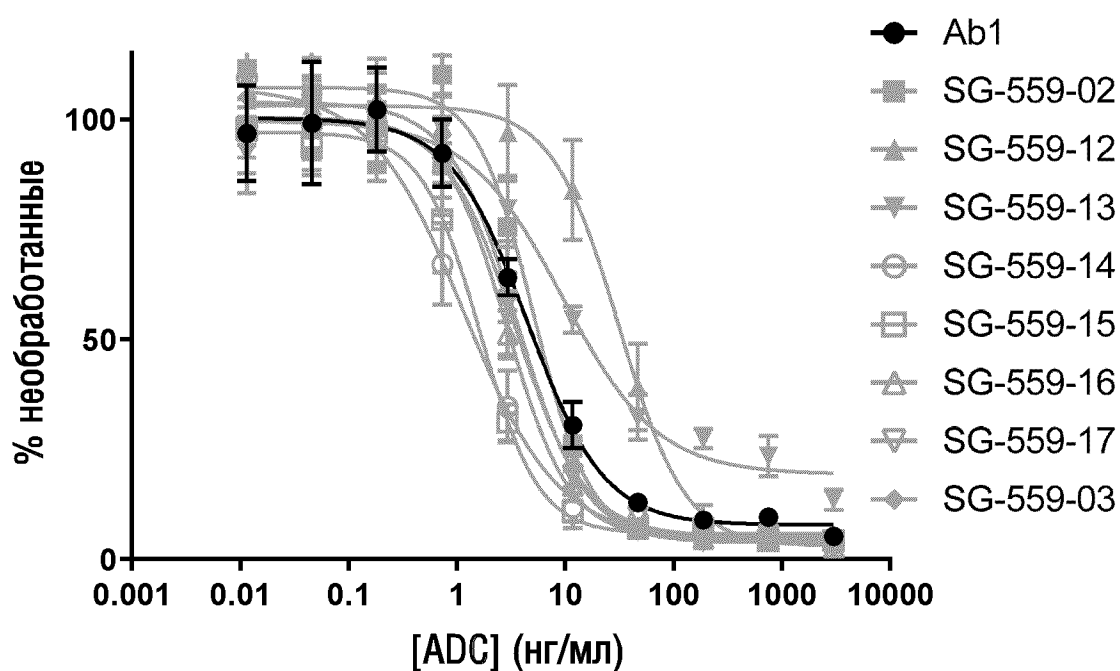
ФИГ.1



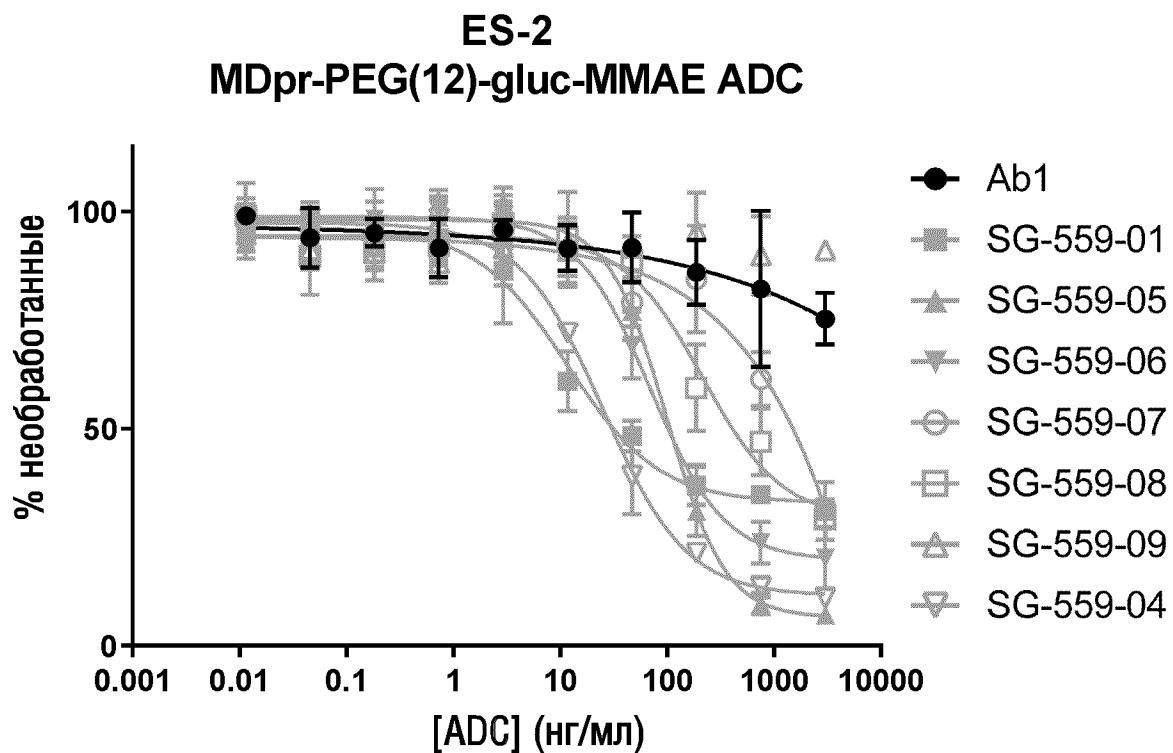
ФИГ.2А



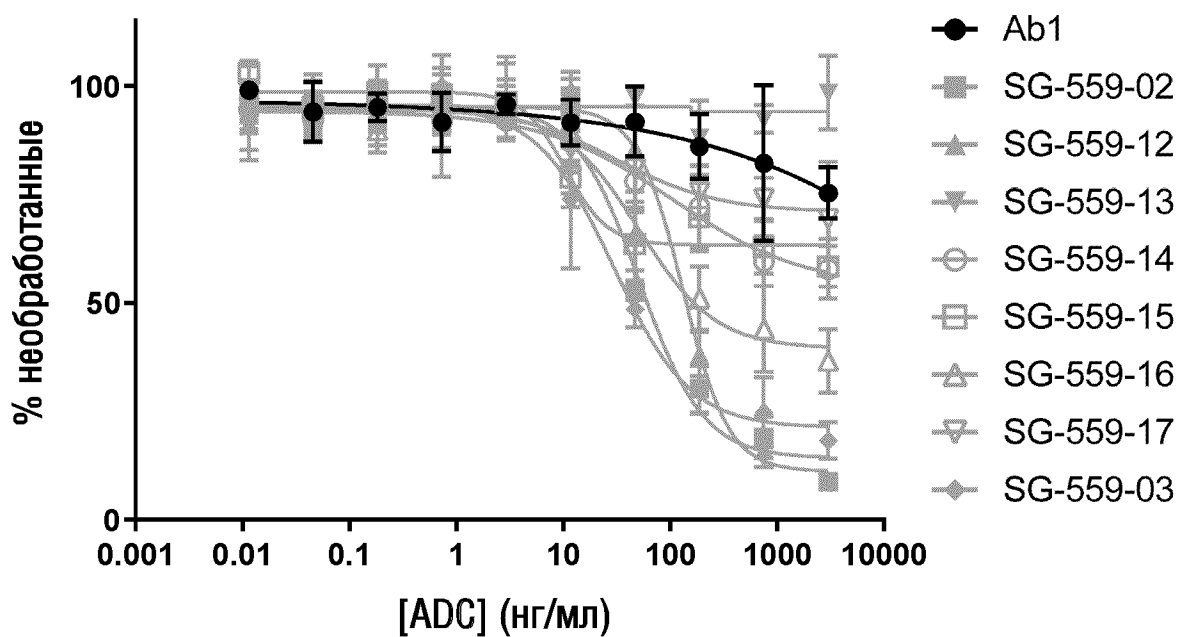
ФИГ.2В



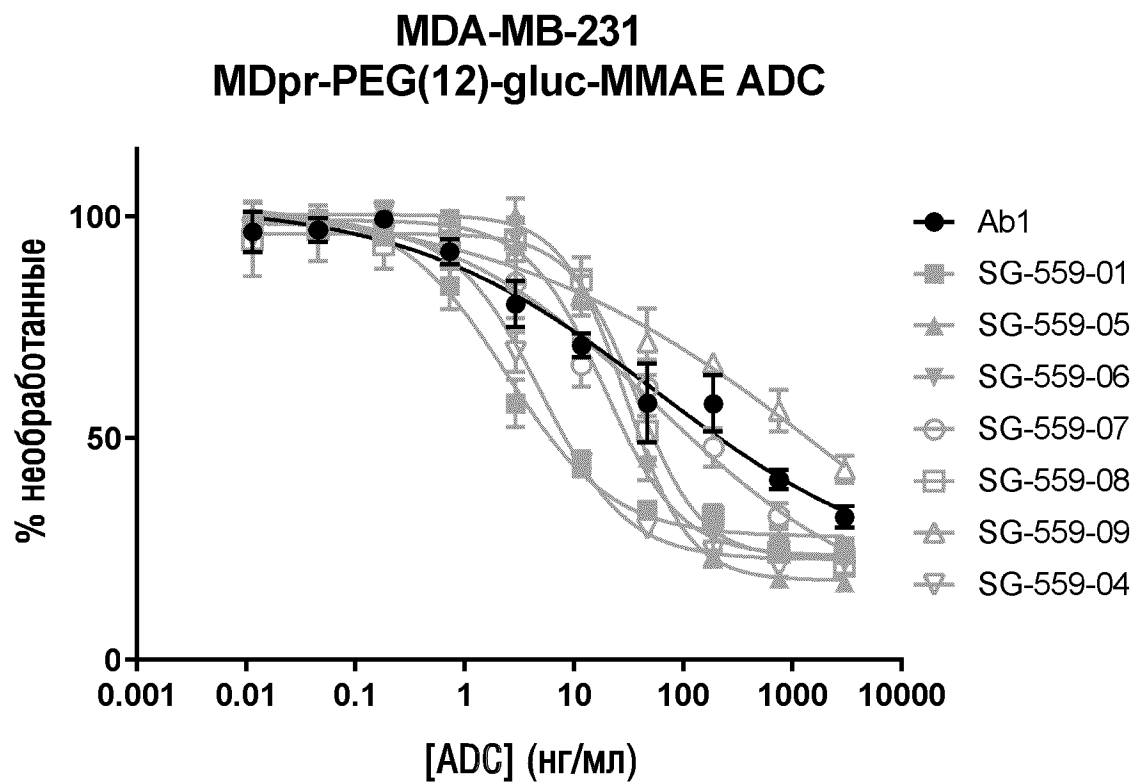
ФИГ.2С



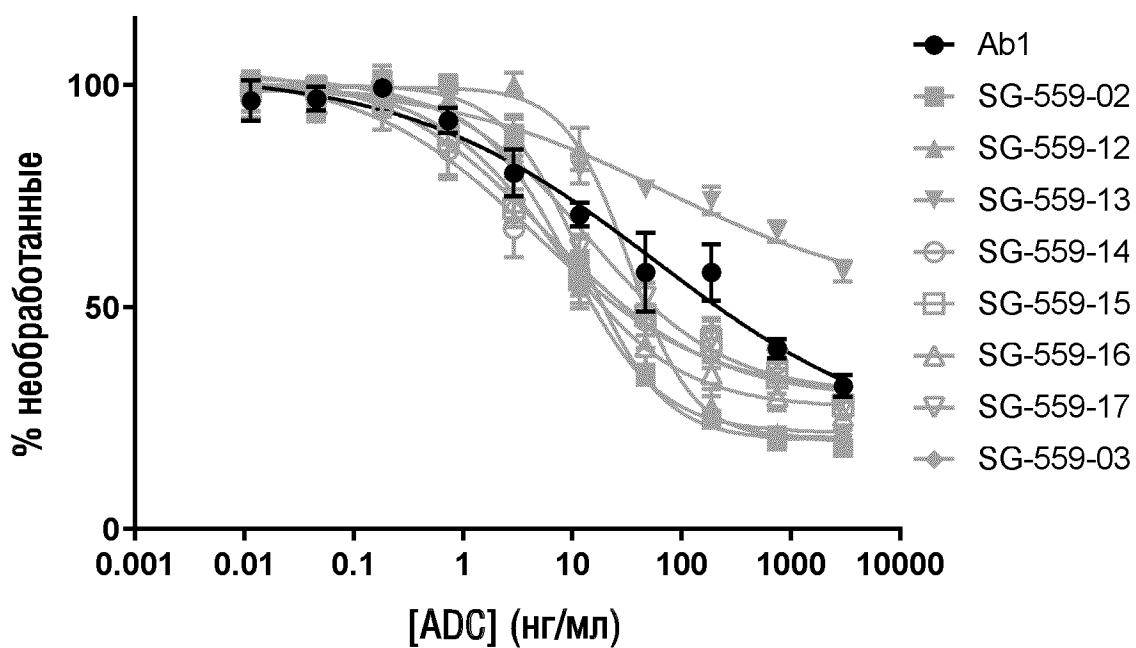
ФИГ.2D



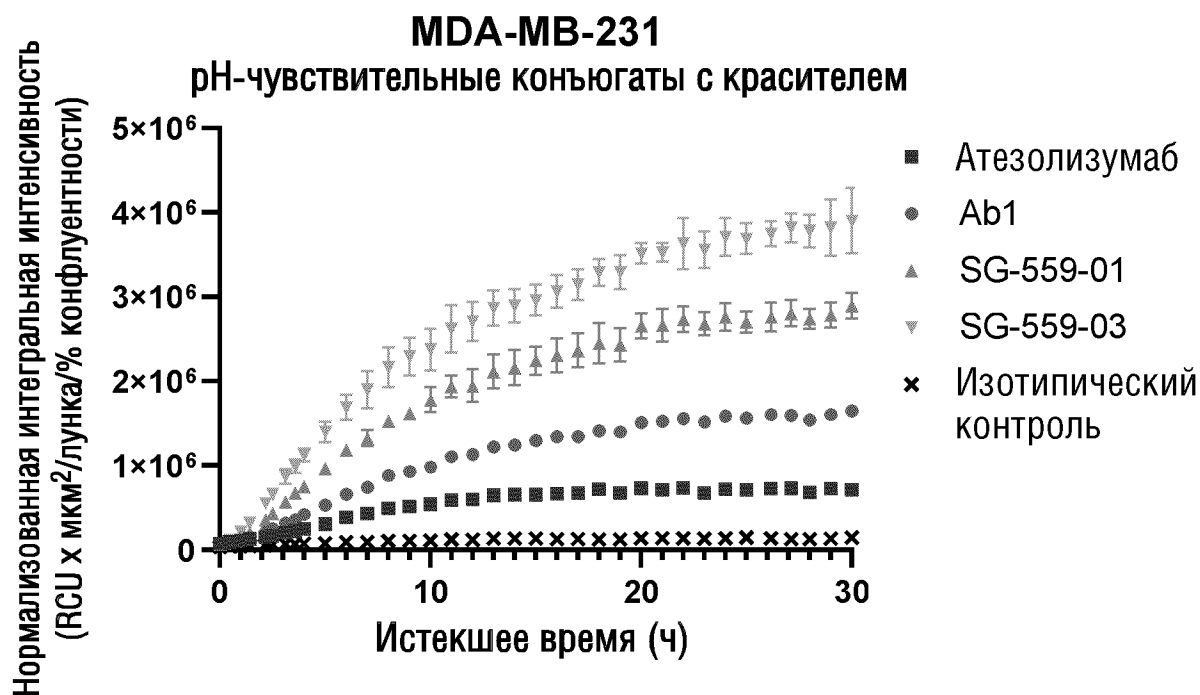
ФИГ.2Е



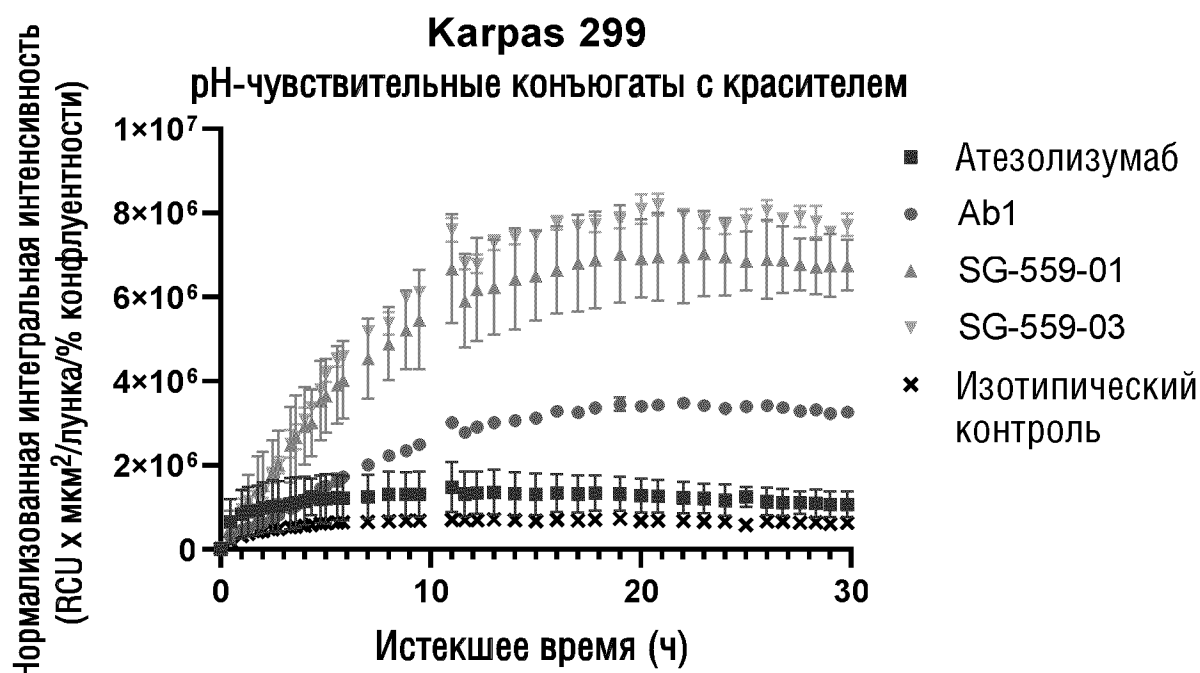
ФИГ.2F



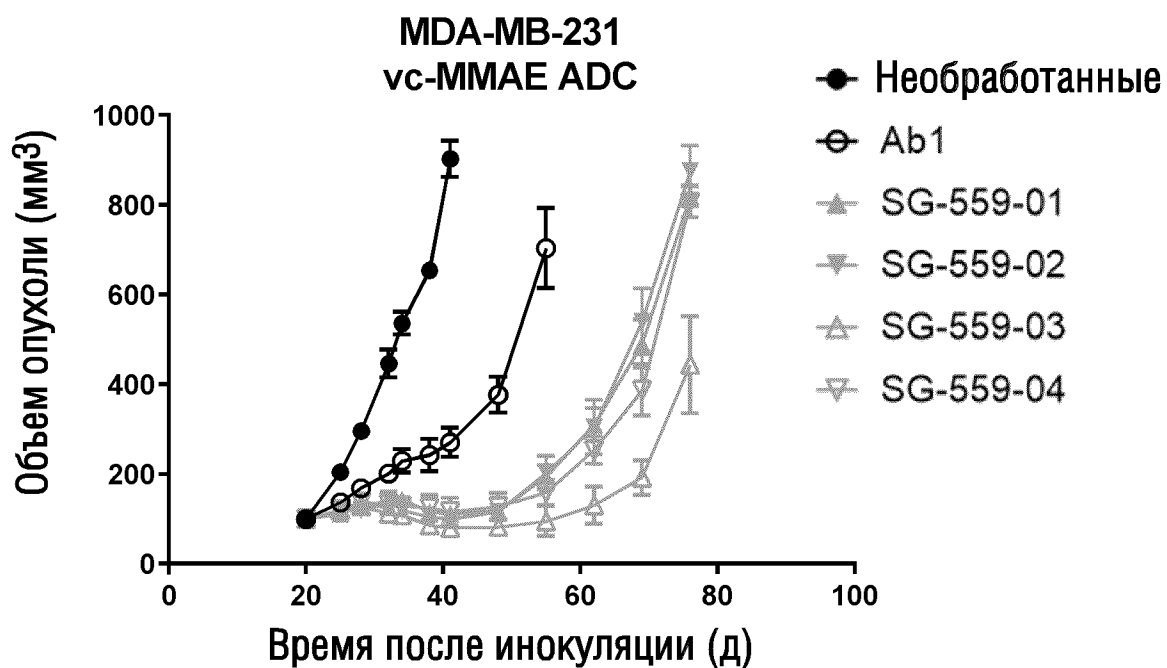
ФИГ.3А



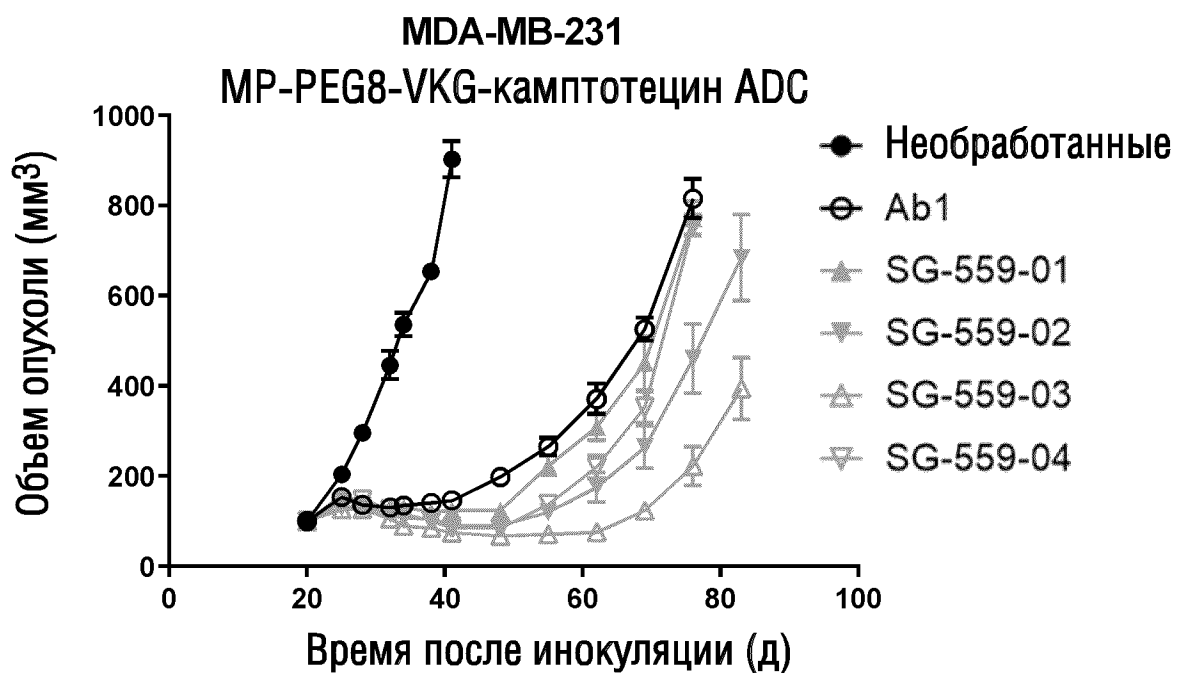
ФИГ.3В



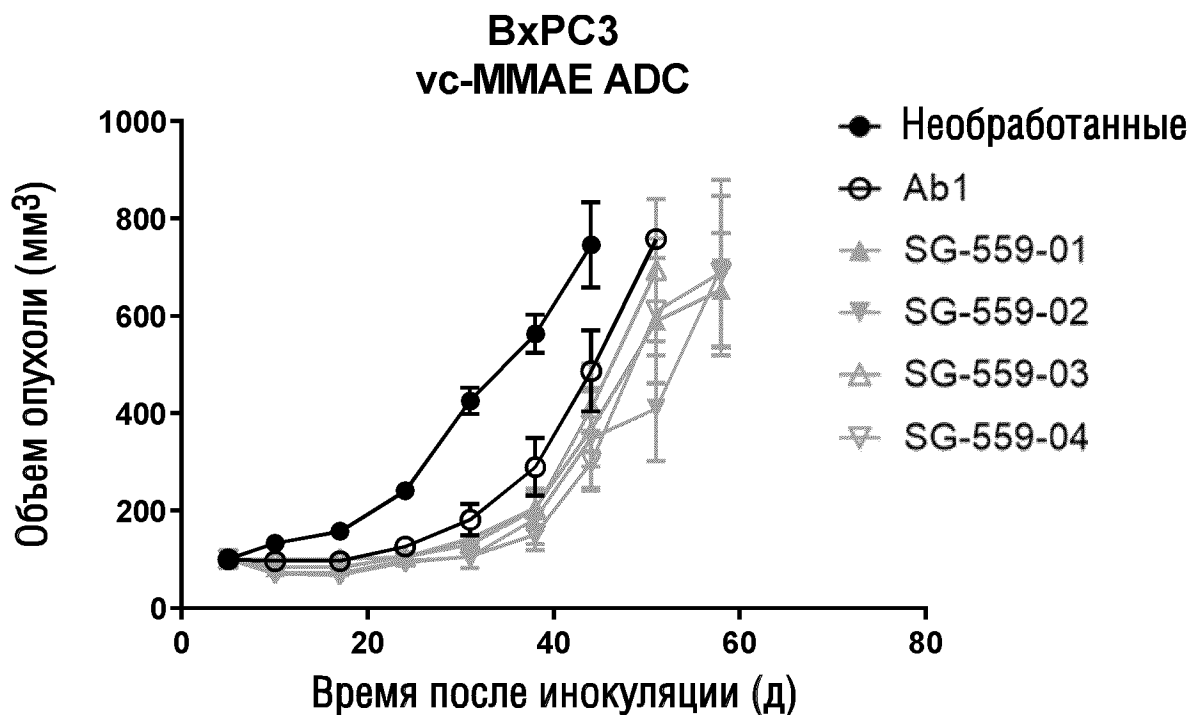
ФИГ.4А



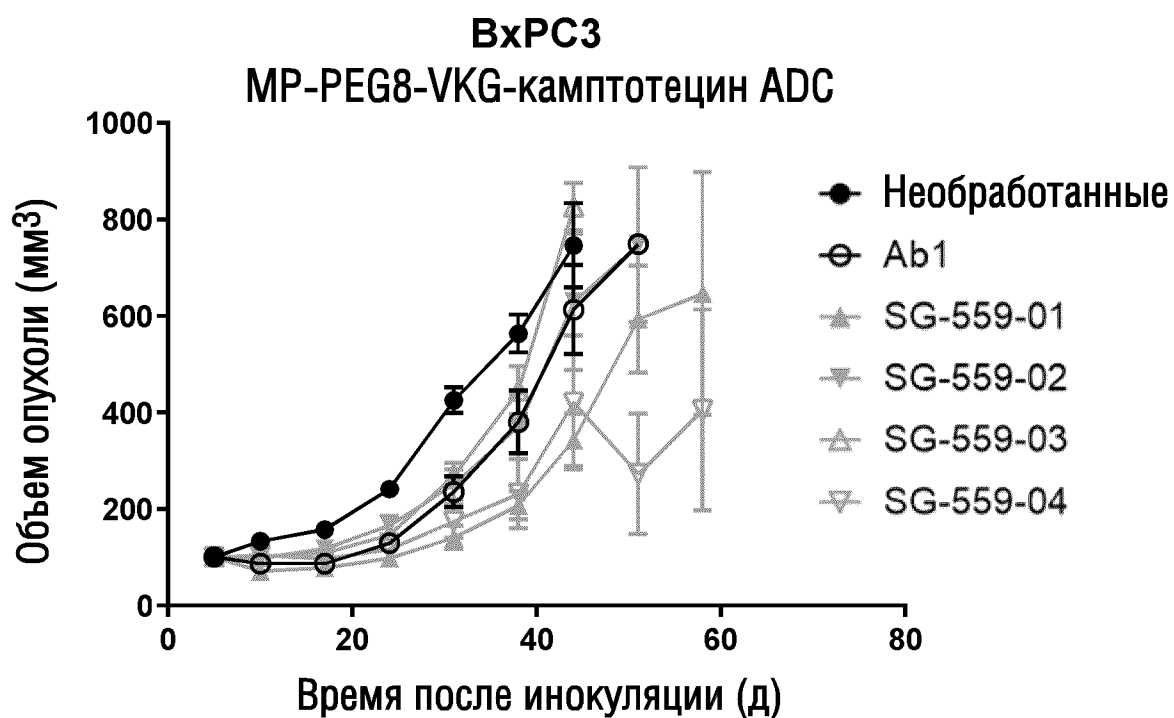
ФИГ.4В



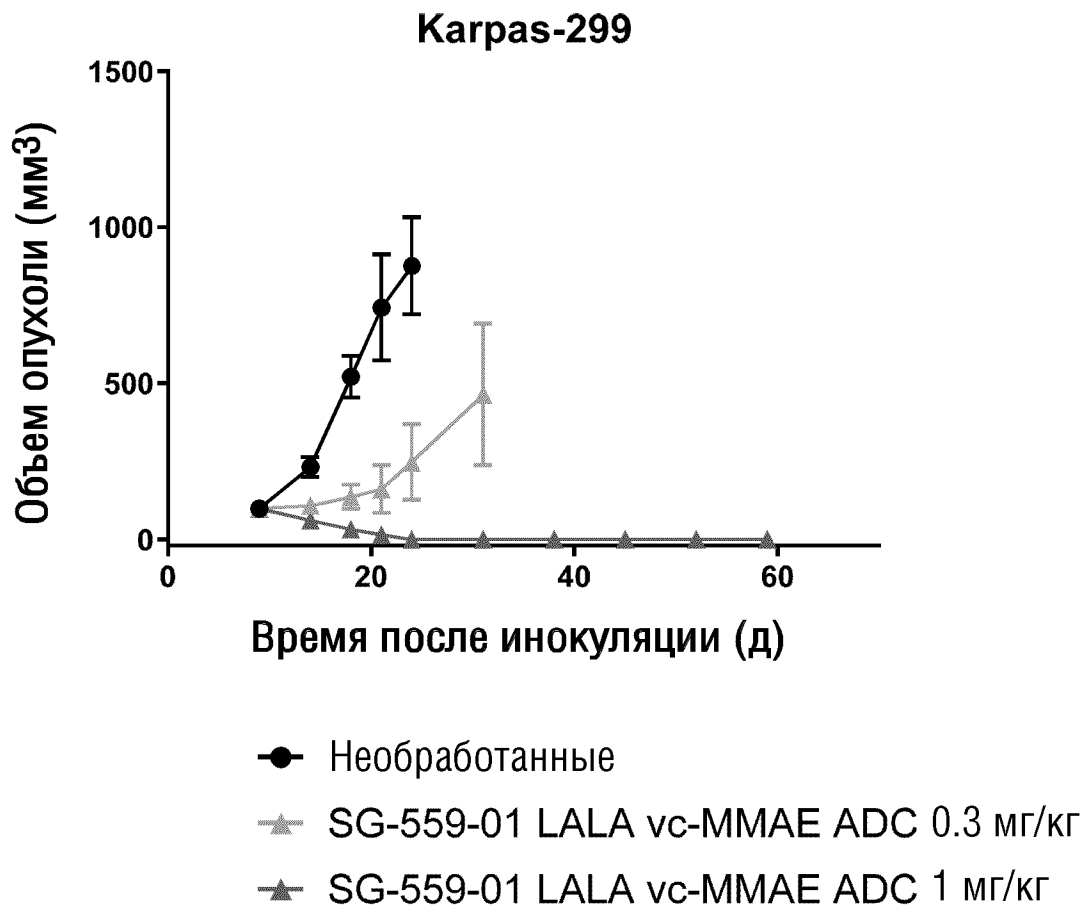
ФИГ.5А



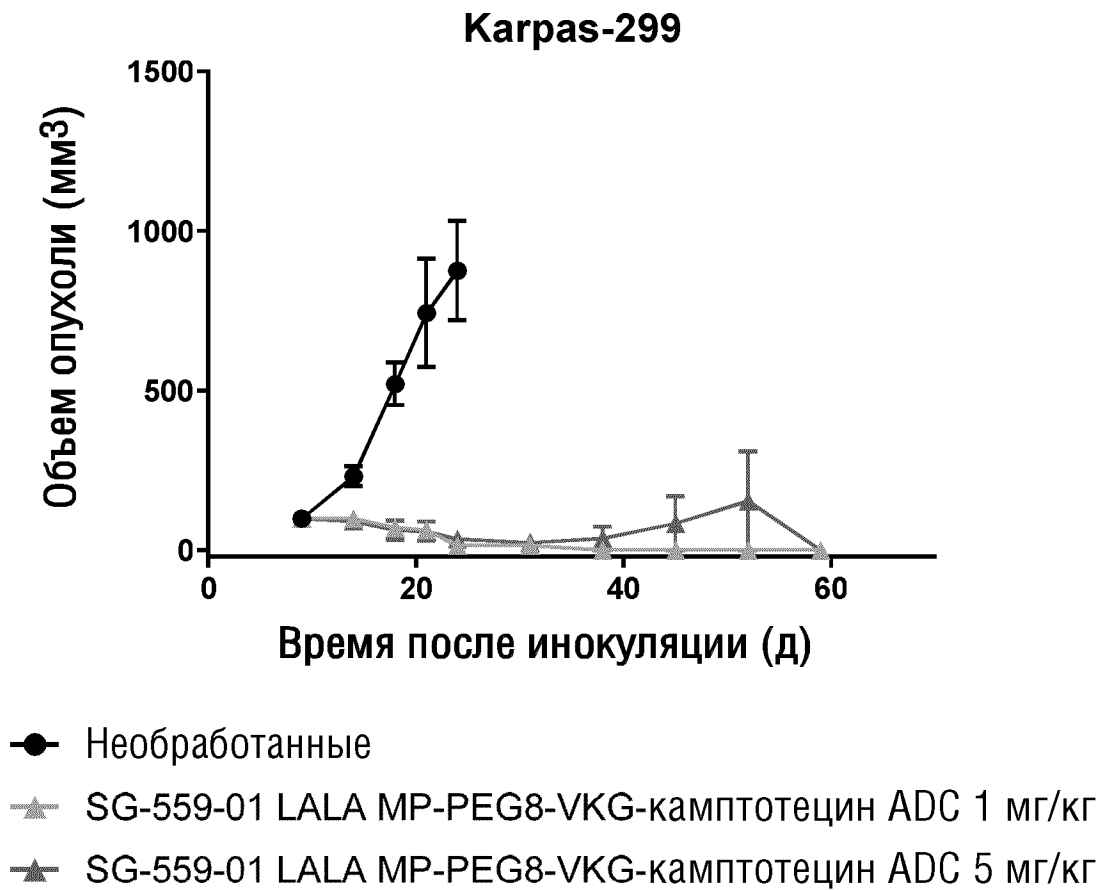
ФИГ.5В



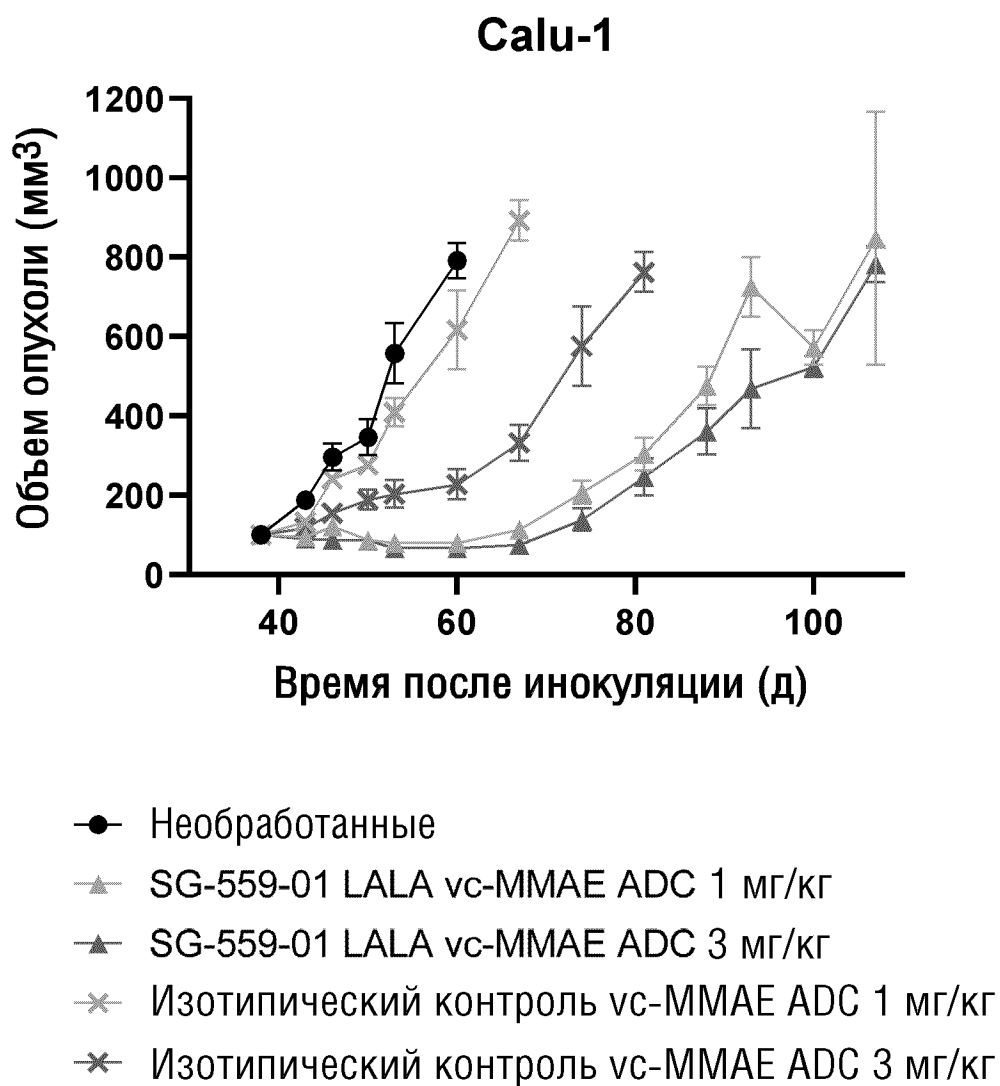
ФИГ.6А



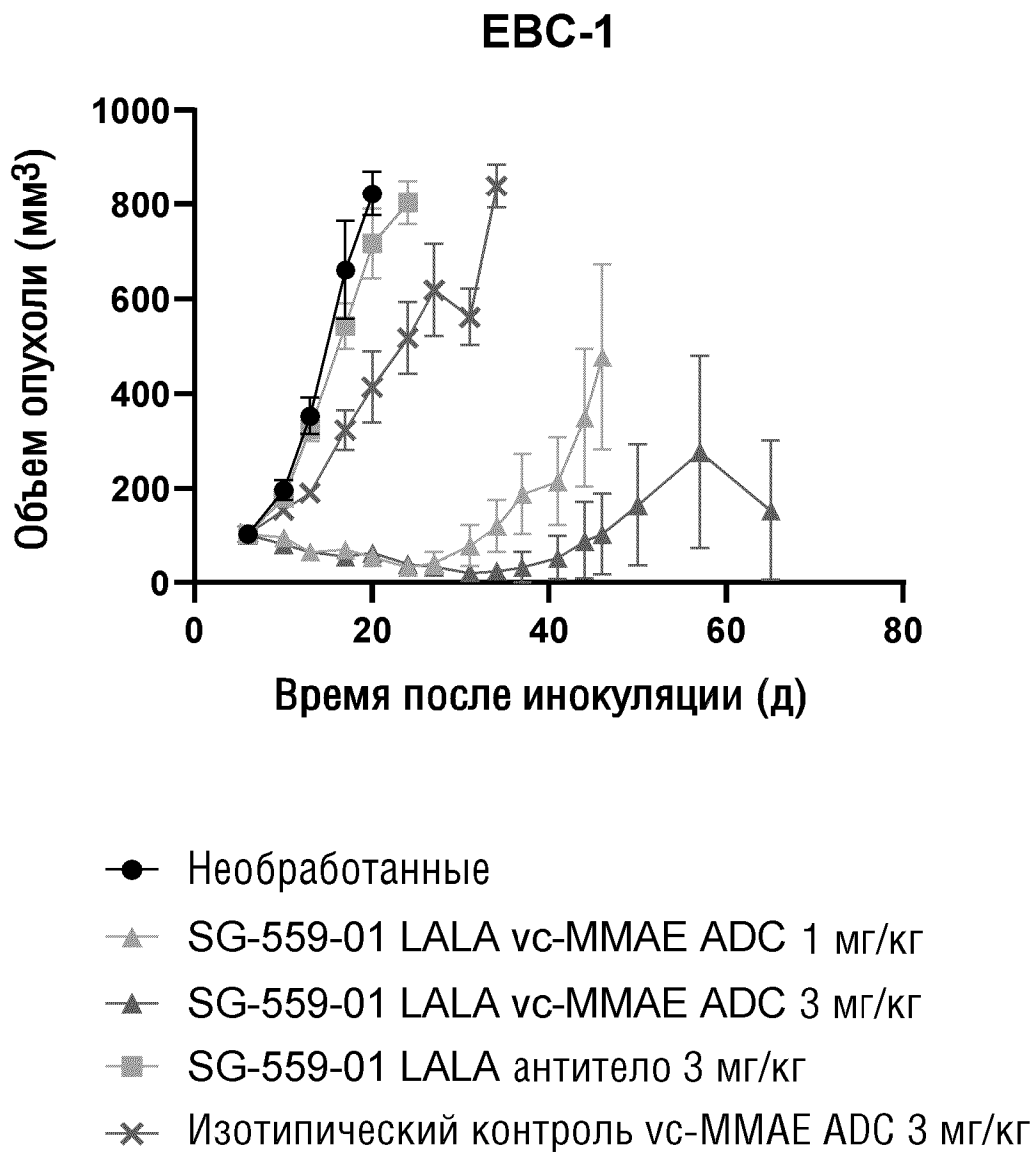
ФИГ.6В



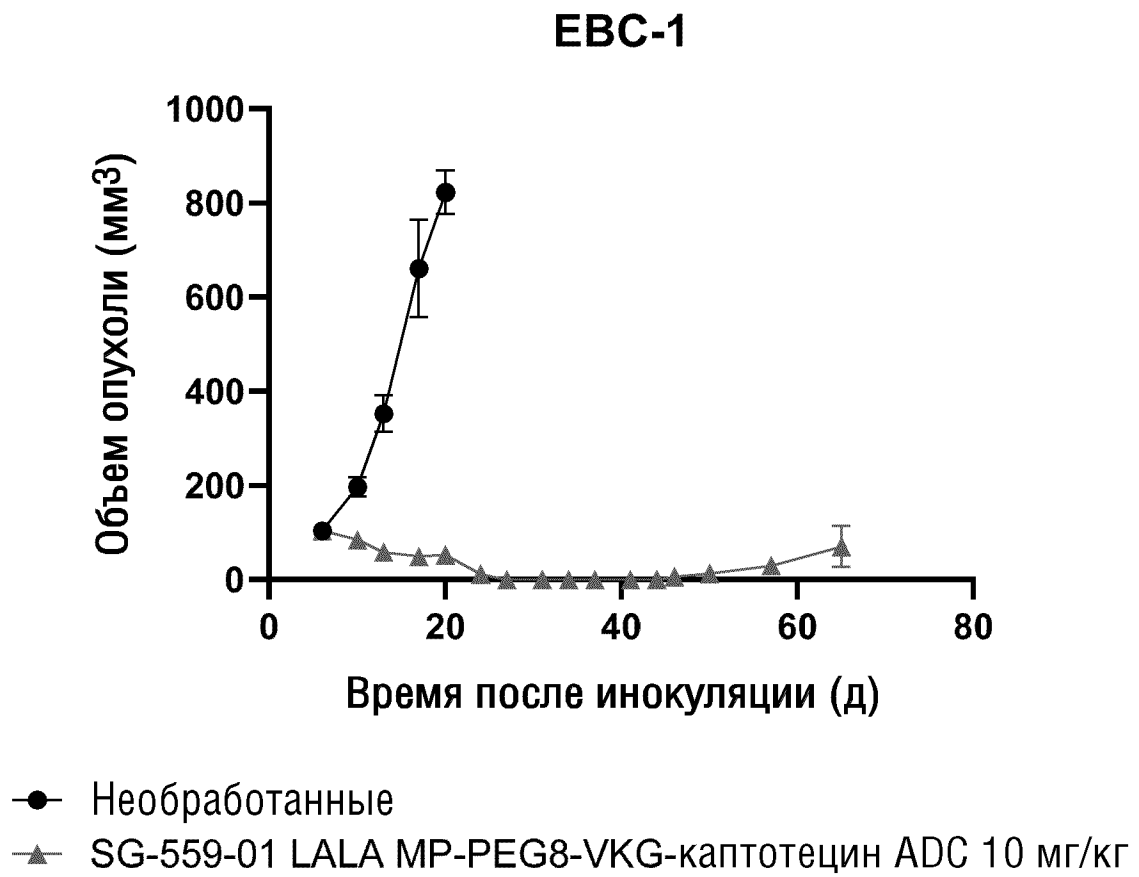
ФИГ.7



ФИГ.8А

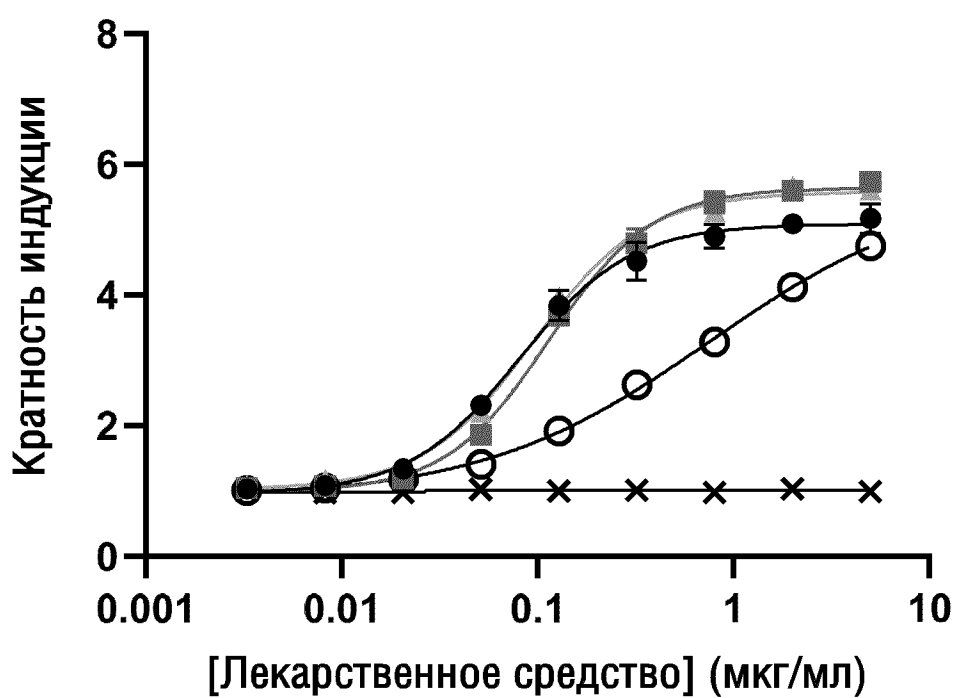


ФИГ.8В



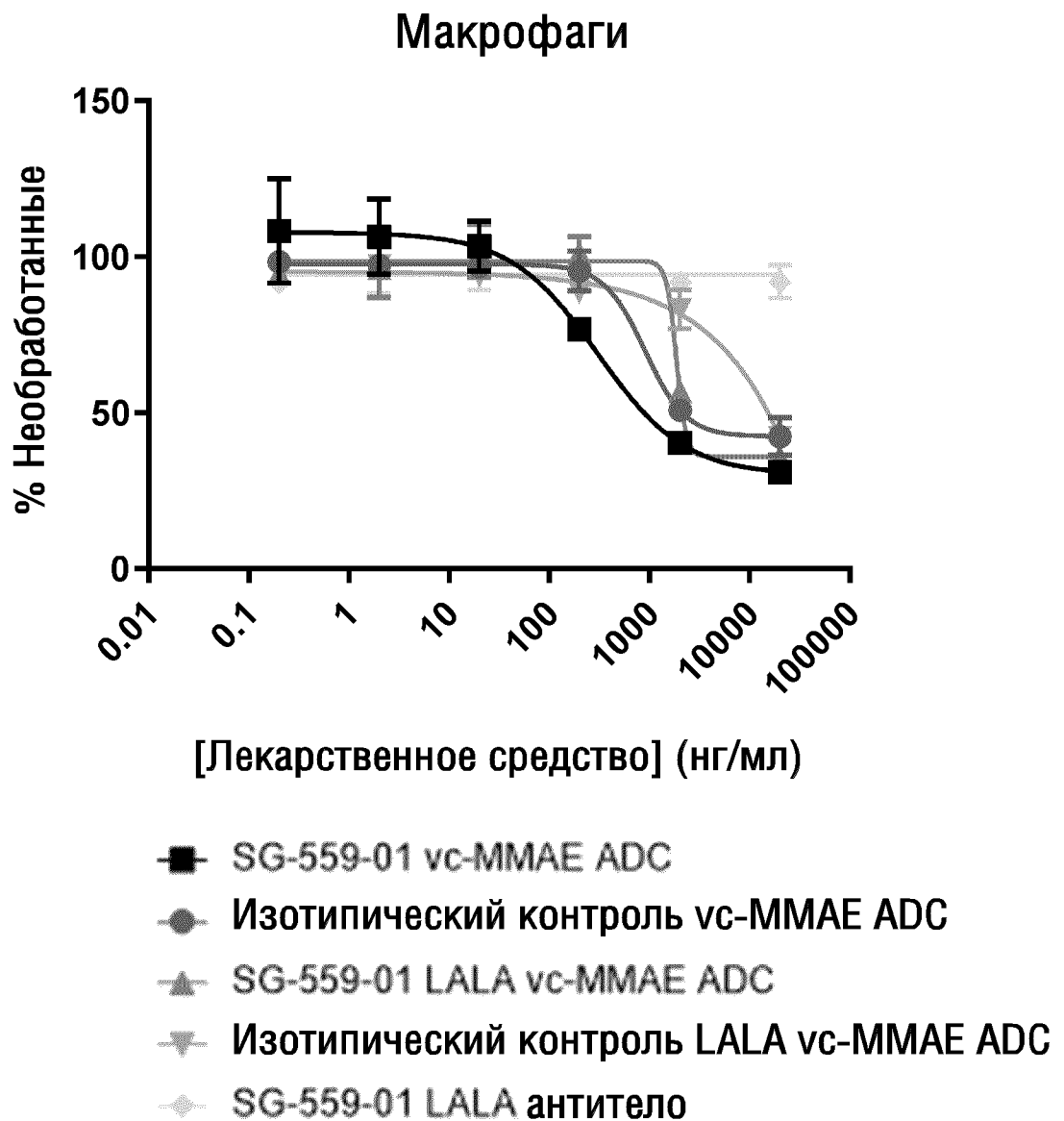
ФИГ.9

Блокирующий анализ PD-1/PD-L1

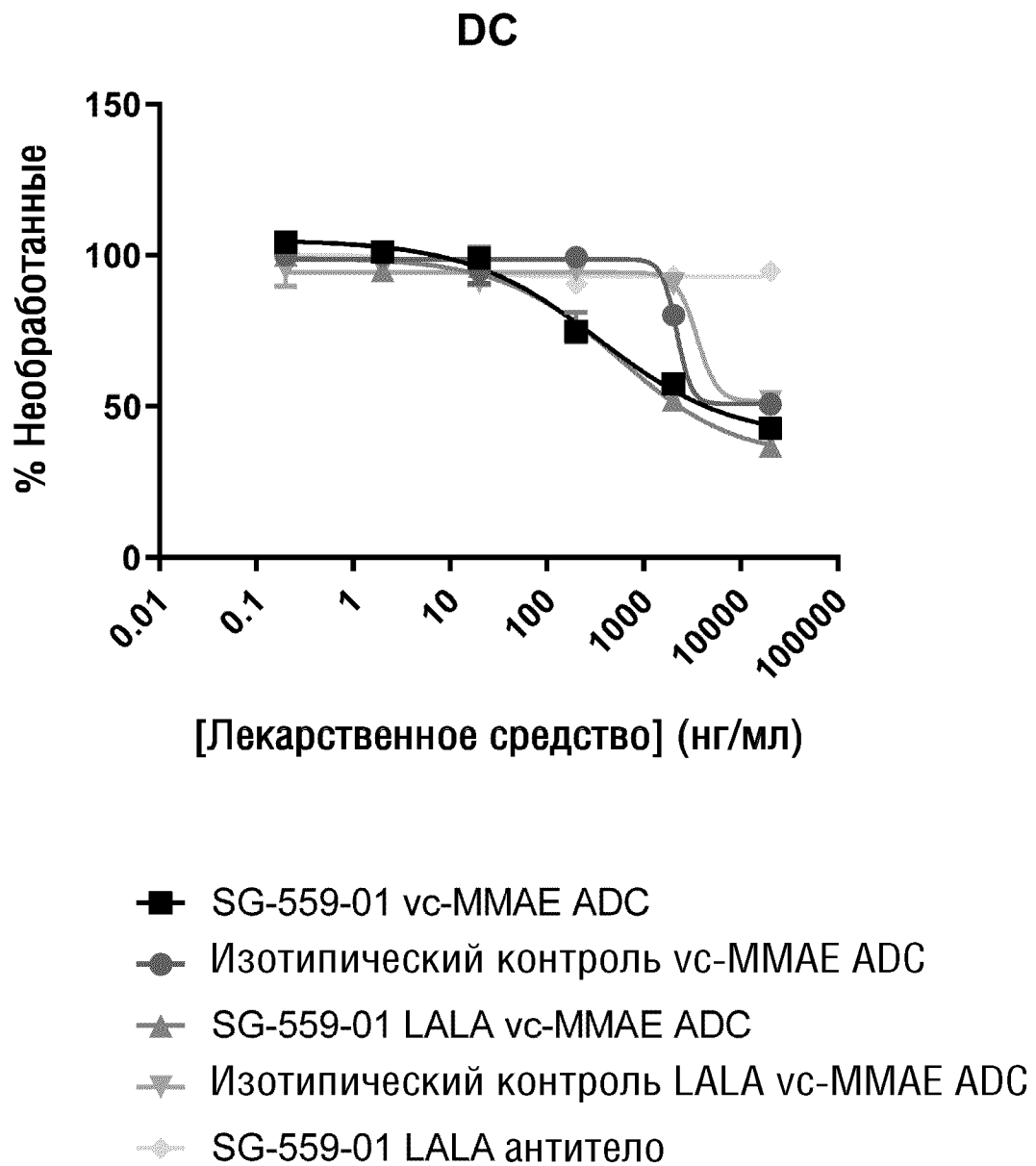


- SG-559-01 LALA антитело
- SG-559-01 LALA vc-MMAE ADC
- ▲ SG-559-01 LALA MP-PEG8-VKG-каптотецин ADC
- Контроль антитела PD-1
- × Изотипический контроль

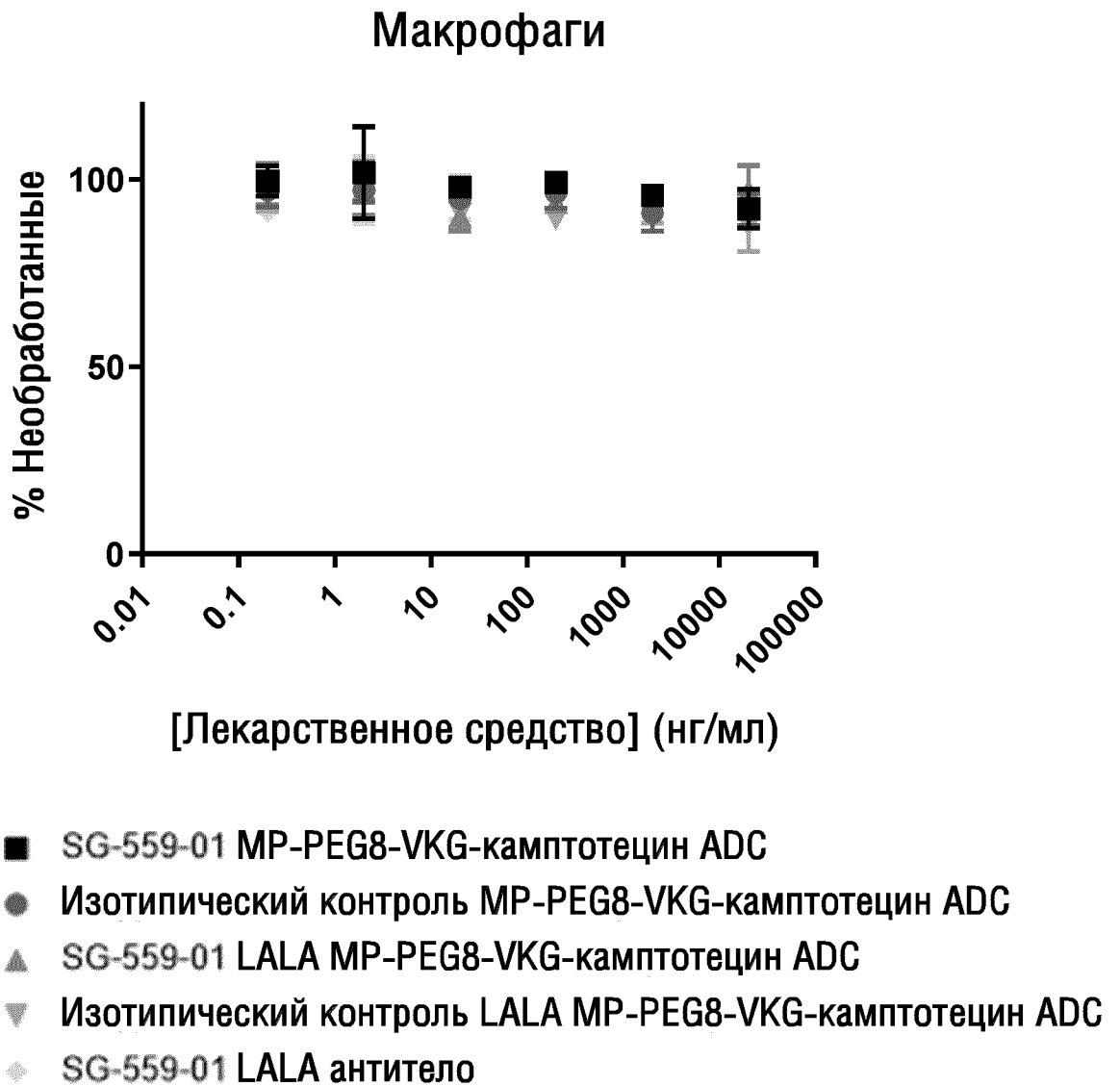
ФИГ.10А



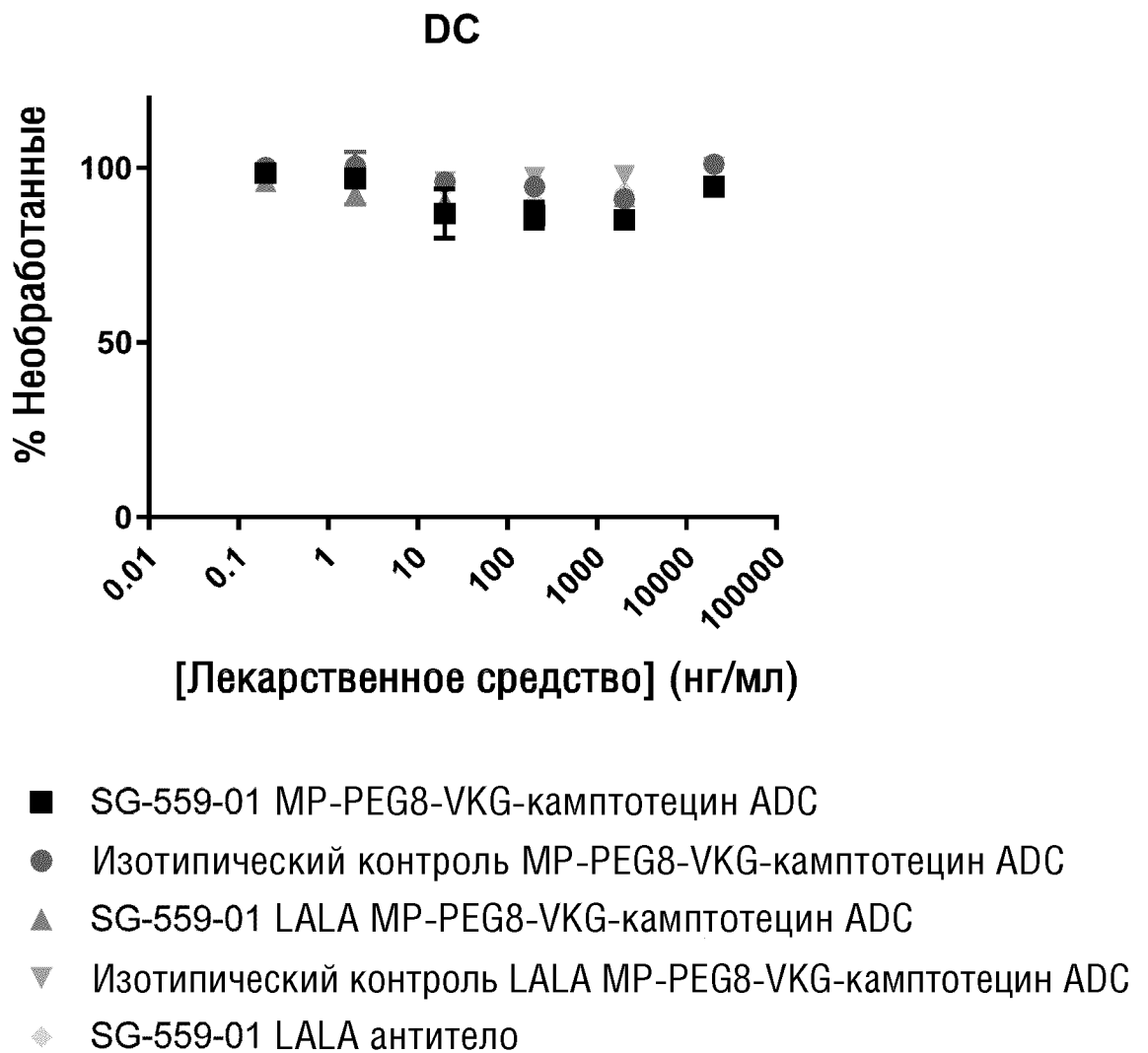
ФИГ.10В



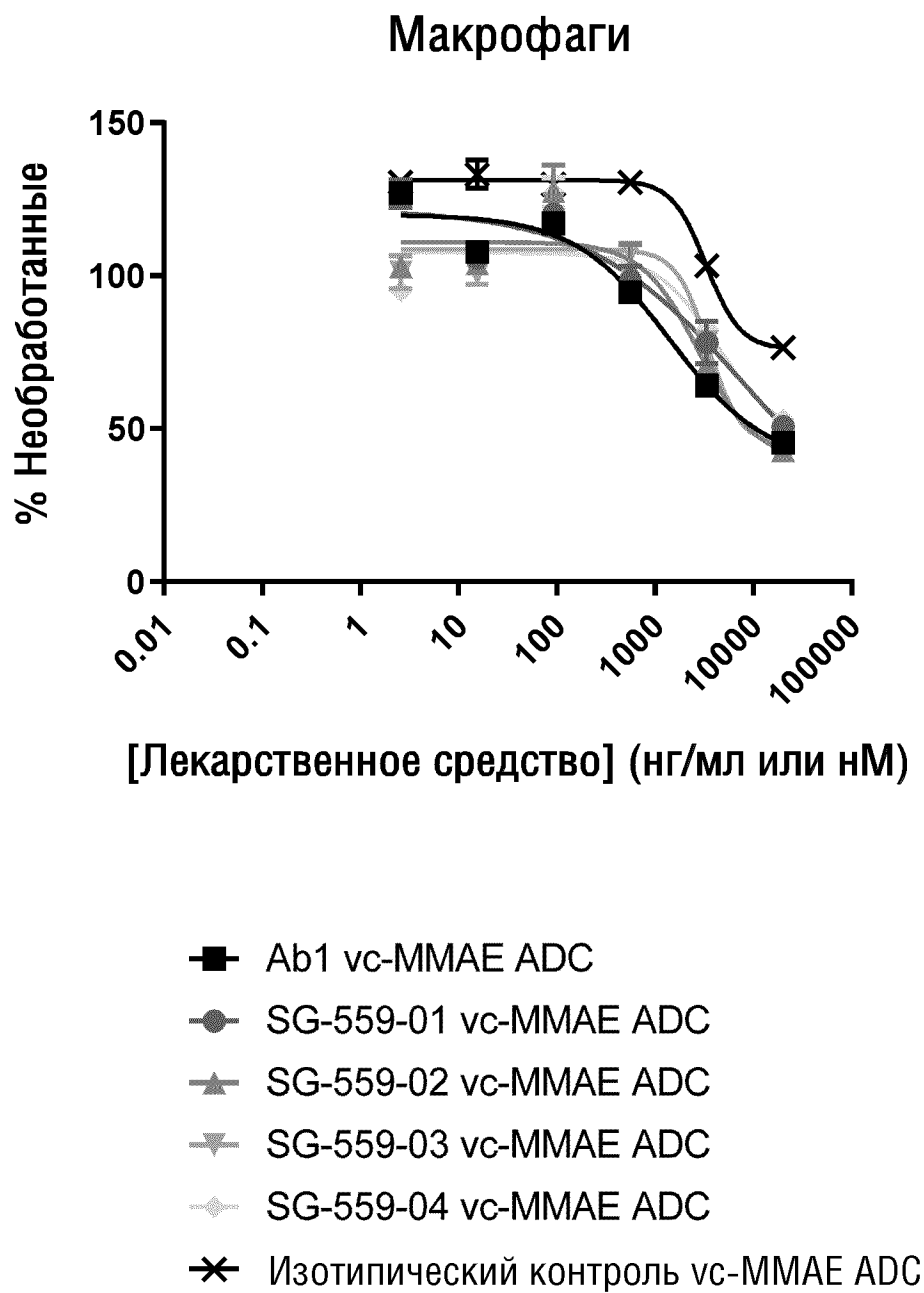
ФИГ.10С



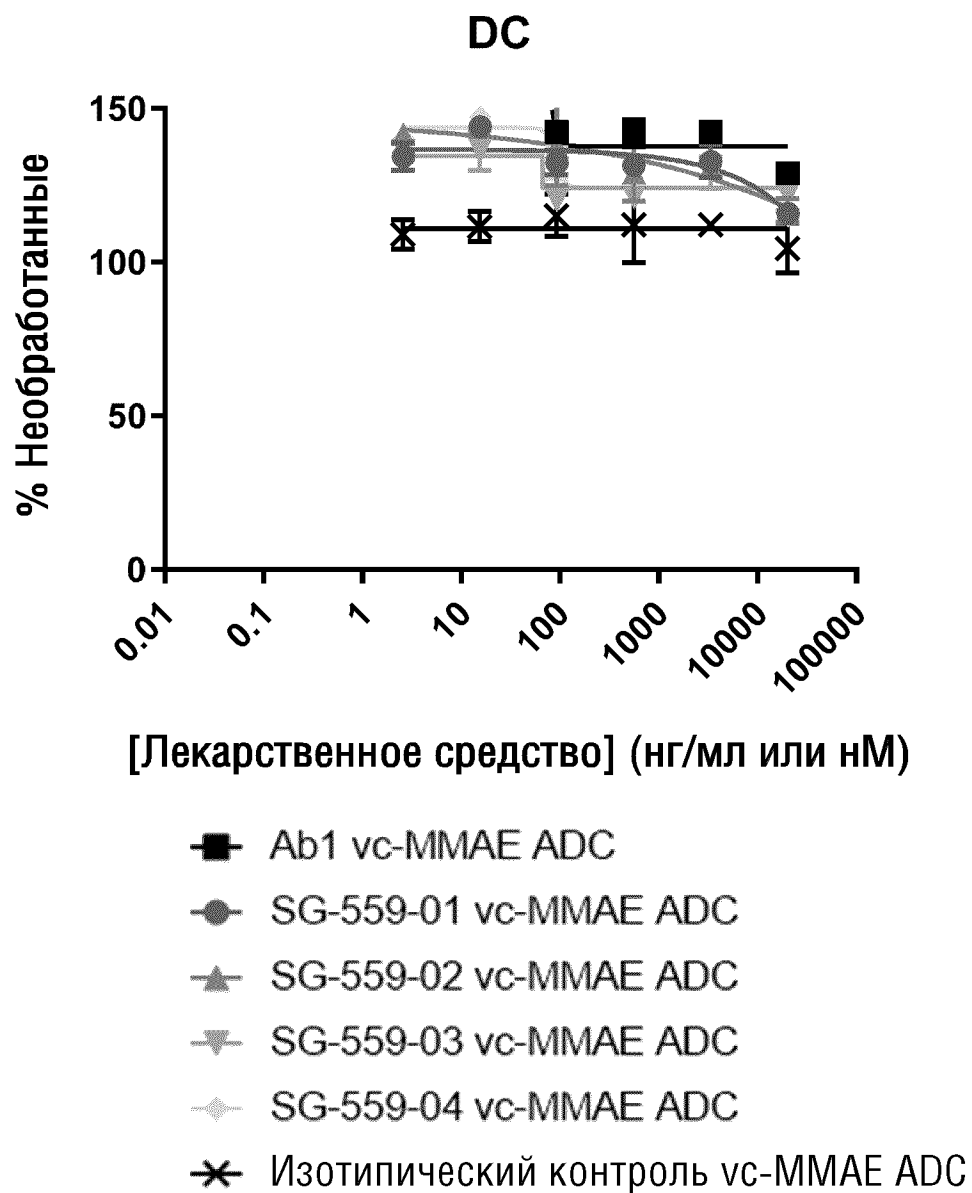
ФИГ.10D



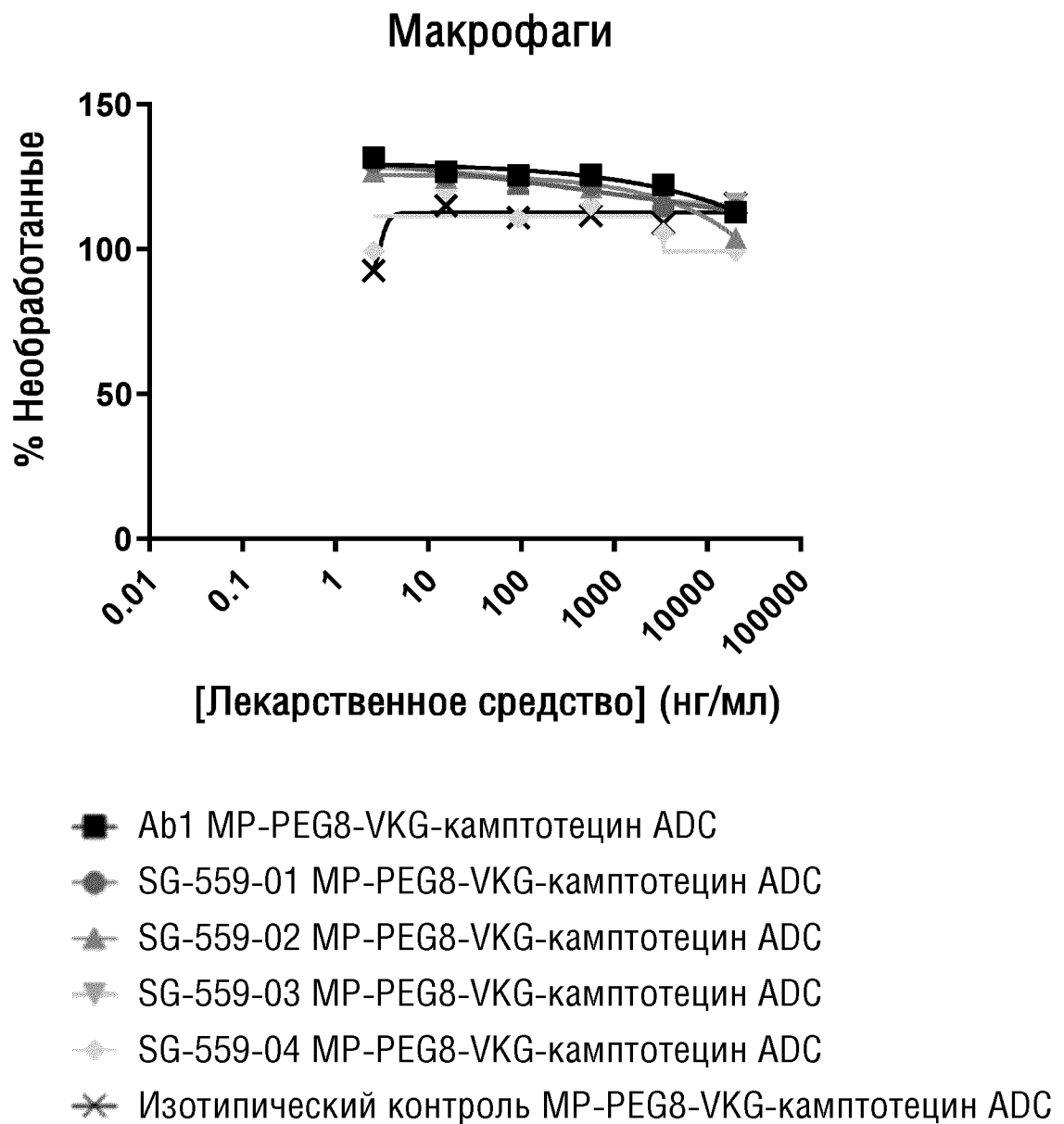
ФИГ.11А



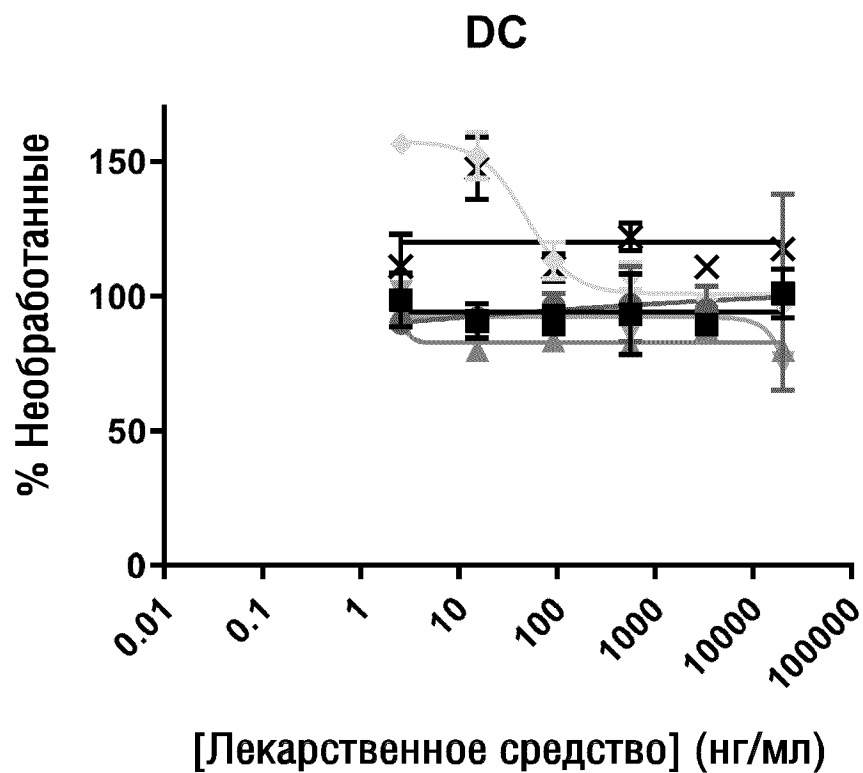
ФИГ.11В



ФИГ.11С



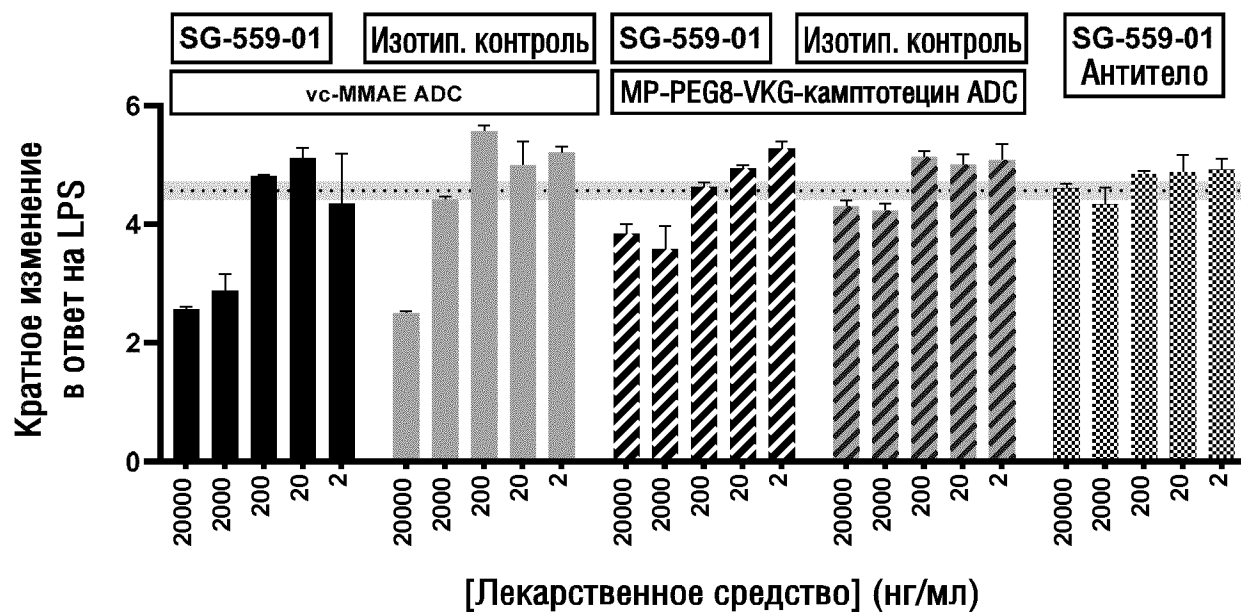
ФИГ.11D



- Ab1 MP-PEG8-VKG-камптотецин ADC
- SG-559-01 MP-PEG8-VKG-камптотецин ADC
- ▲ SG-559-02 MP-PEG8-VKG-камптотецин ADC
- ▼ SG-559-03 MP-PEG8-VKG-камптотецин ADC
- ◆ SG-559-04 MP-PEG8-VKG-камптотецин ADC
- ✕ Изотипический контроль MP-PEG8-VKG-камптотецин ADC

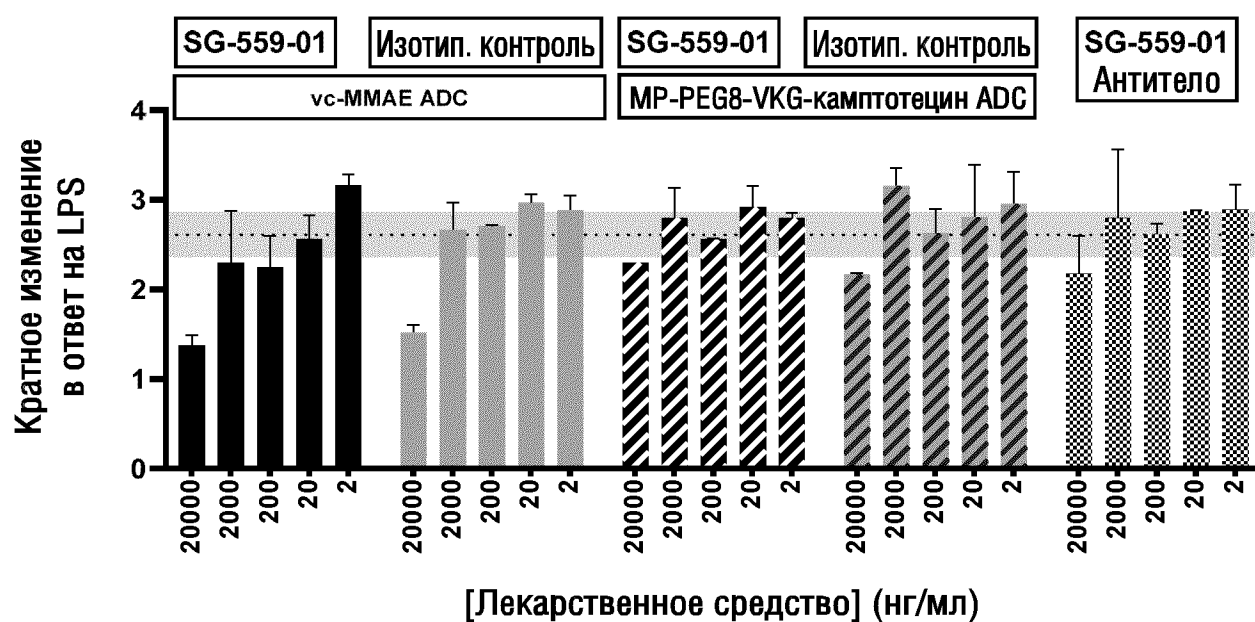
ФИГ.12А

Положительная регуляция МНС класса II макрофагов в ответ на LPS



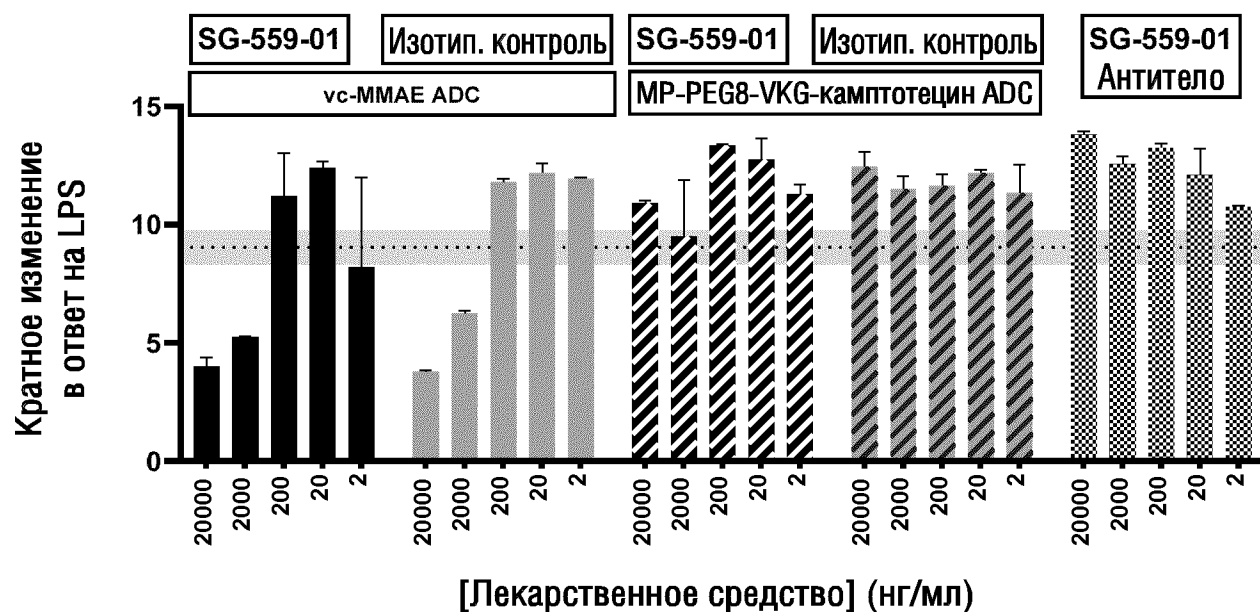
ФИГ.12В

Положительная регуляция МНС класса II DC в ответ на LPS



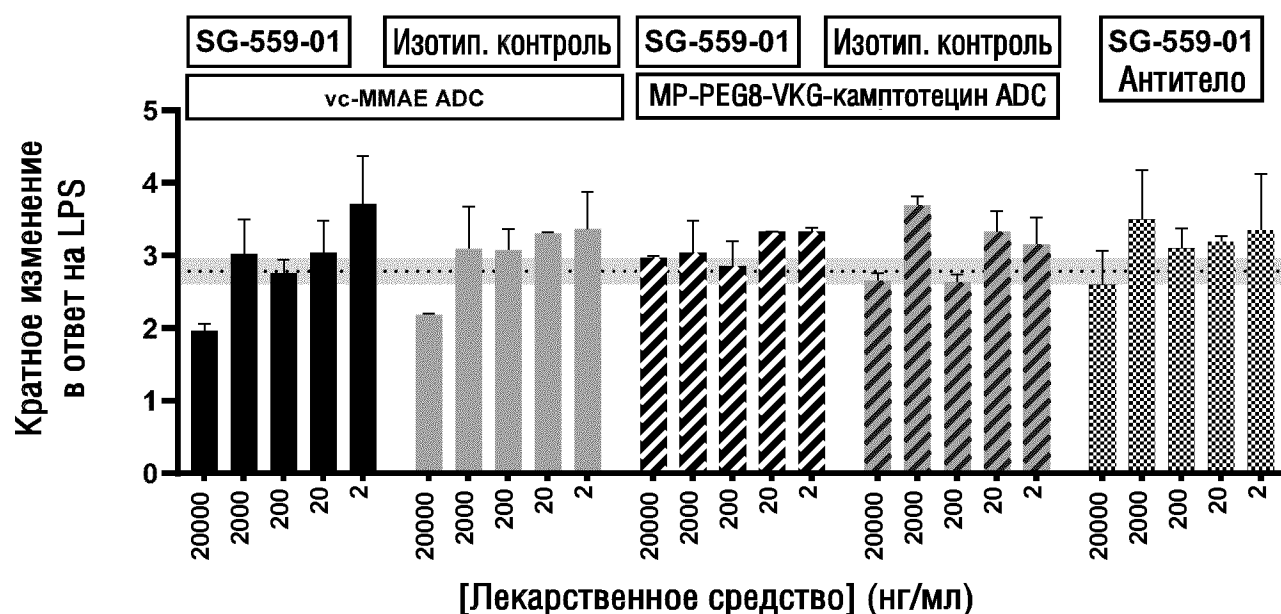
ФИГ.12С

Положительная регуляция МНС класса II CD86 макрофагов в ответ на LPS

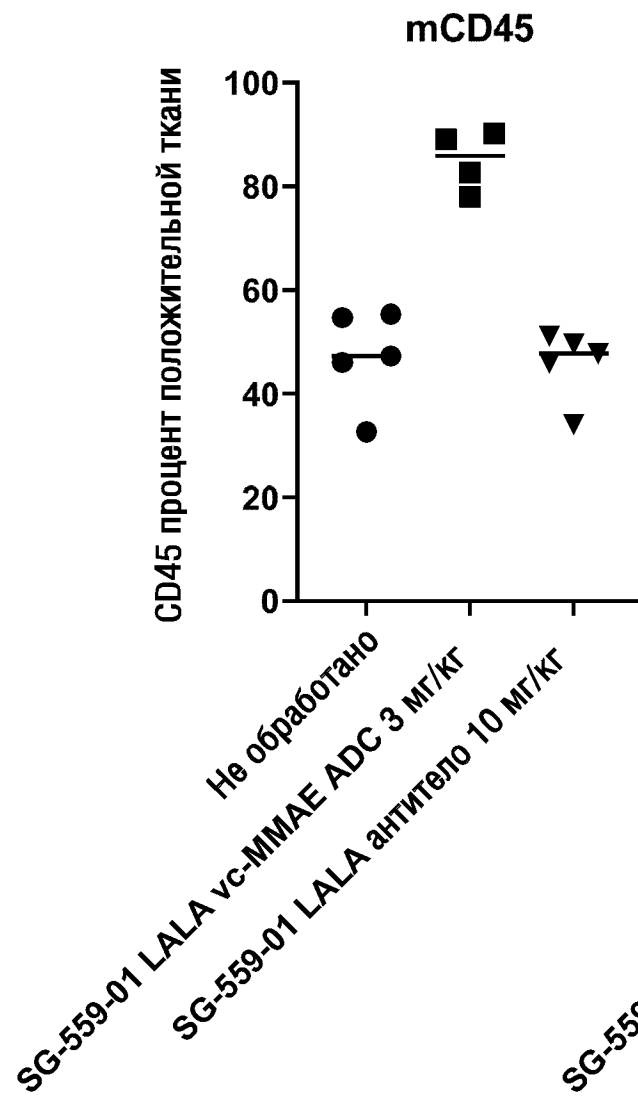


ФИГ.12D

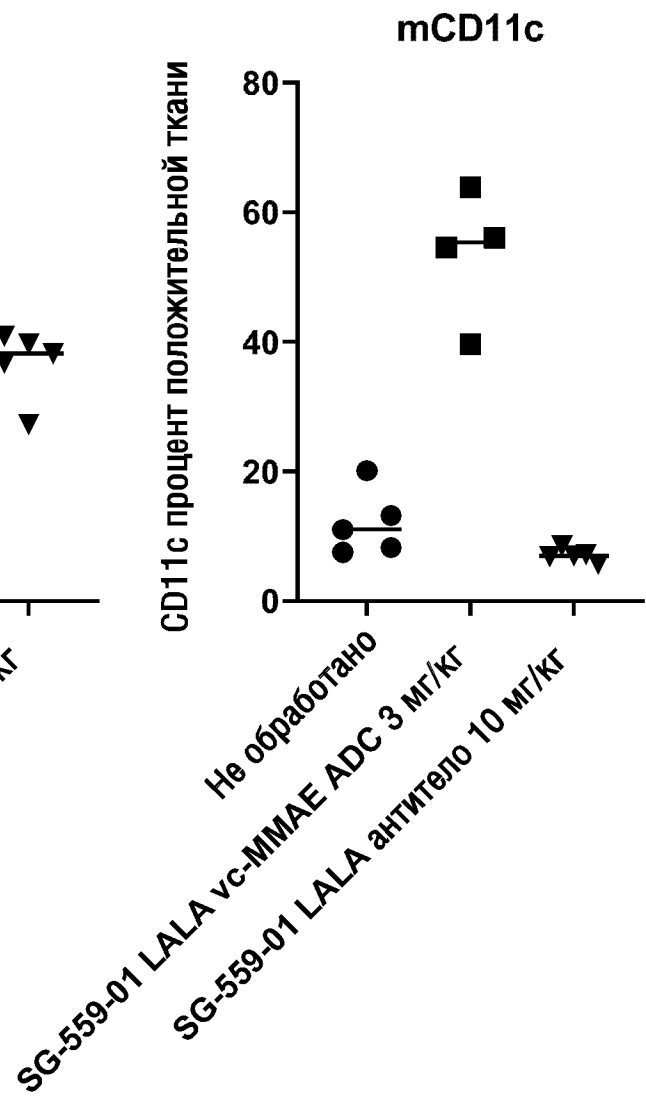
Положительная регуляция МНС класса II CD86 DC в ответ на LPS



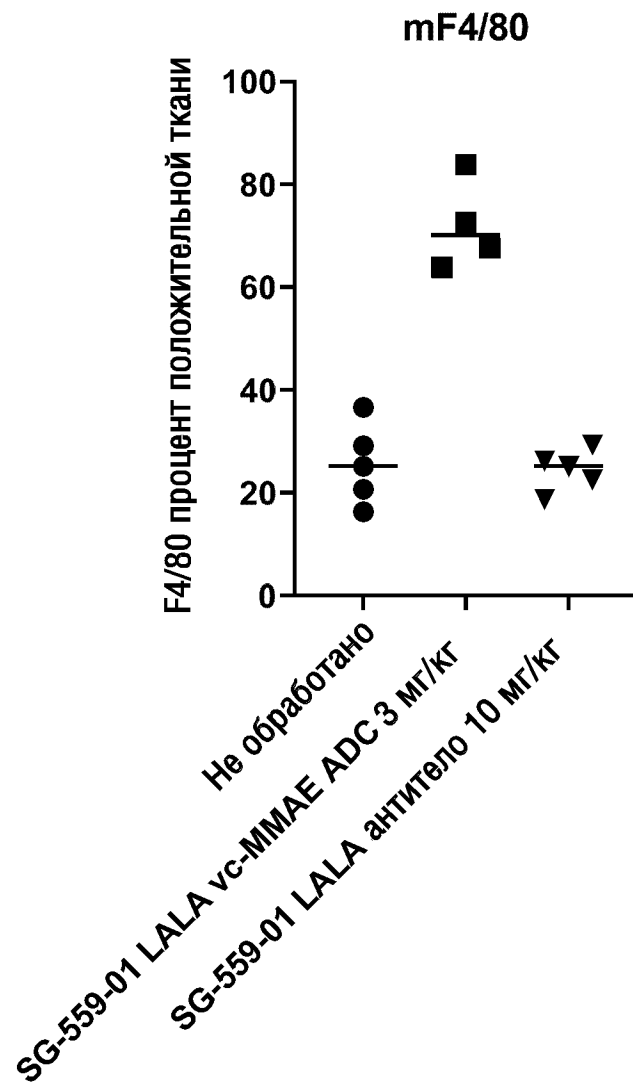
ФИГ.13А



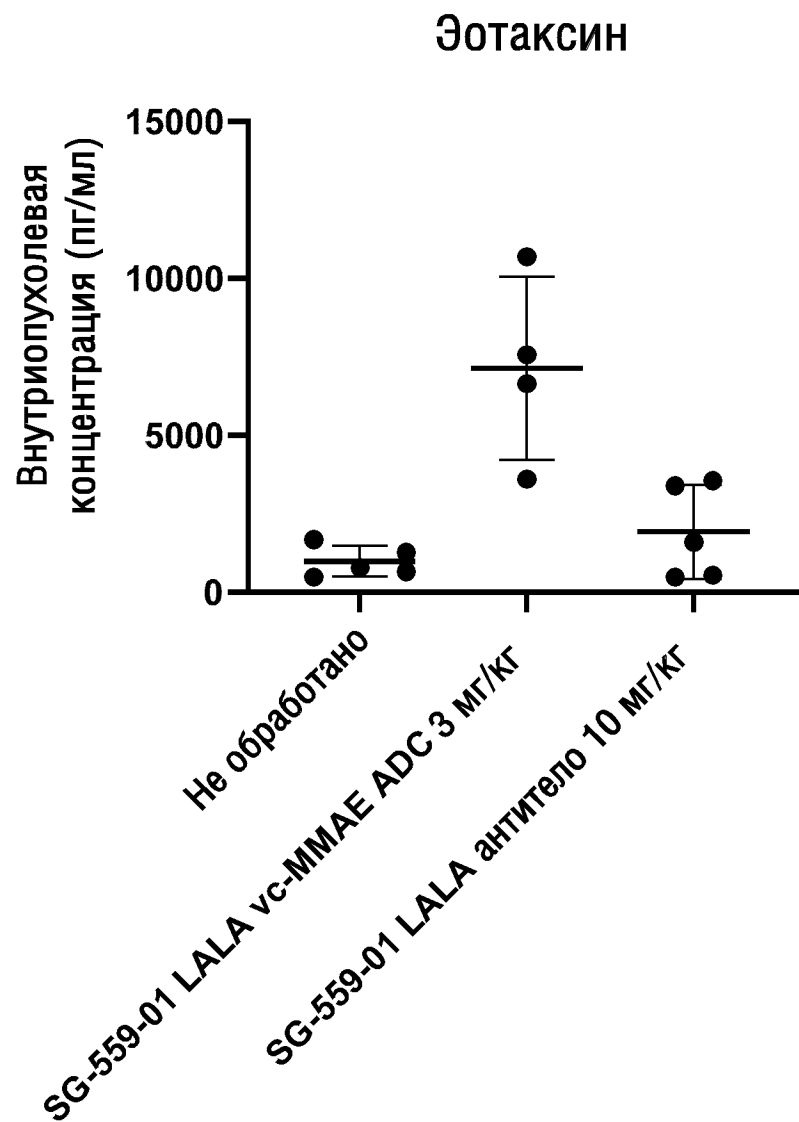
ФИГ.13В



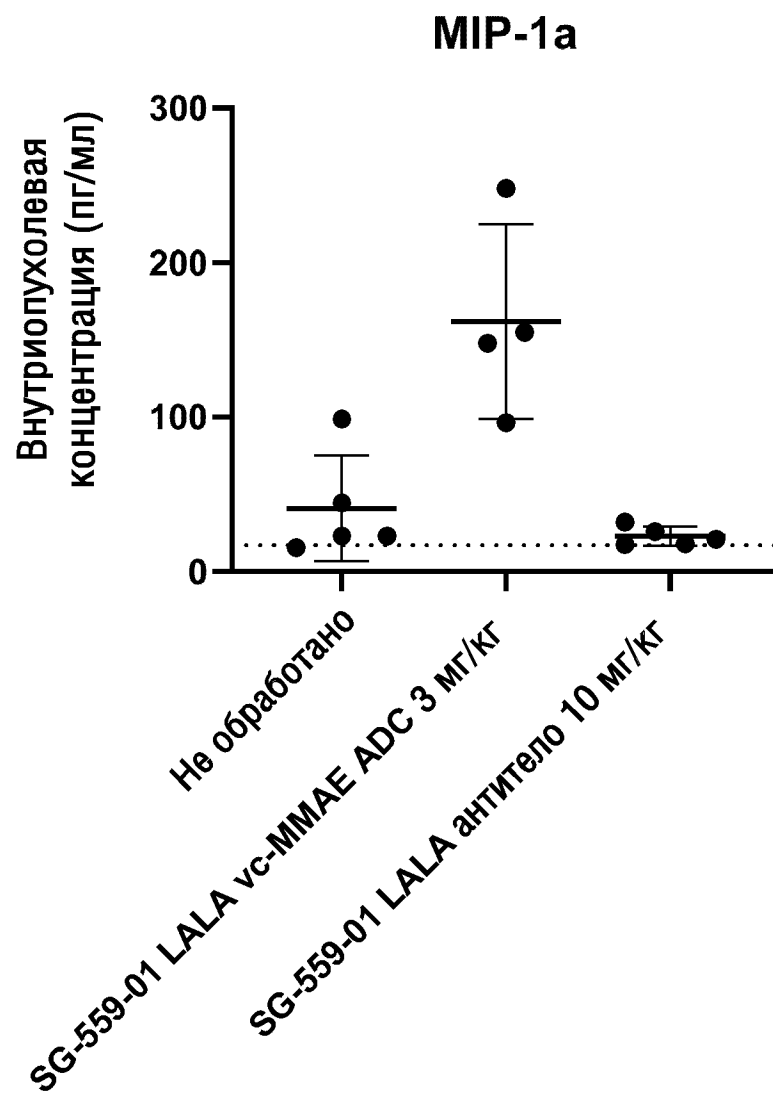
ФИГ.13С



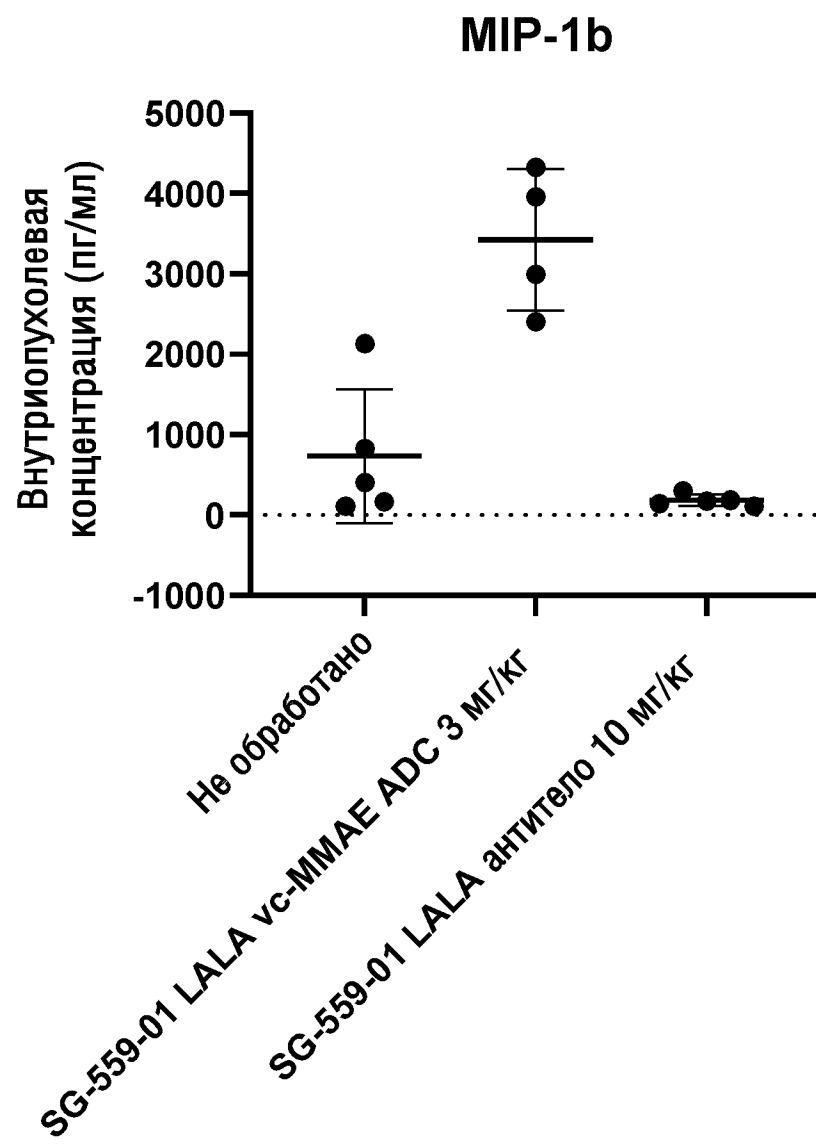
ФИГ.14А



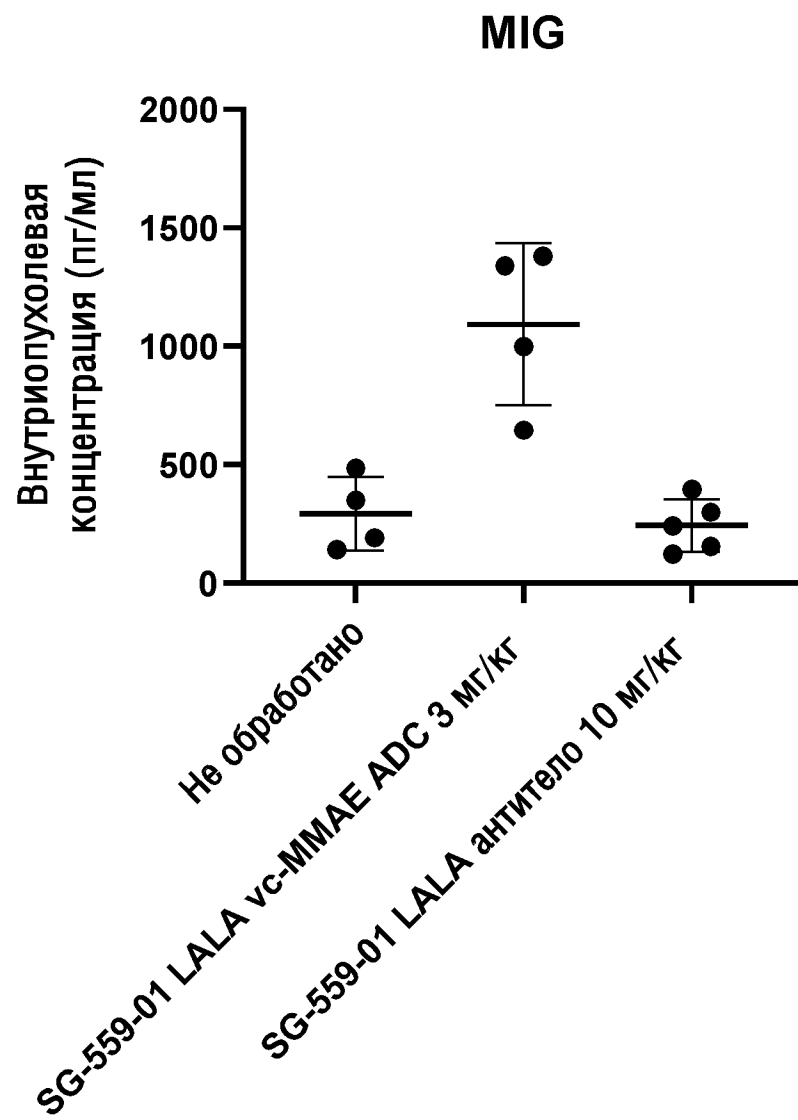
ФИГ.14В



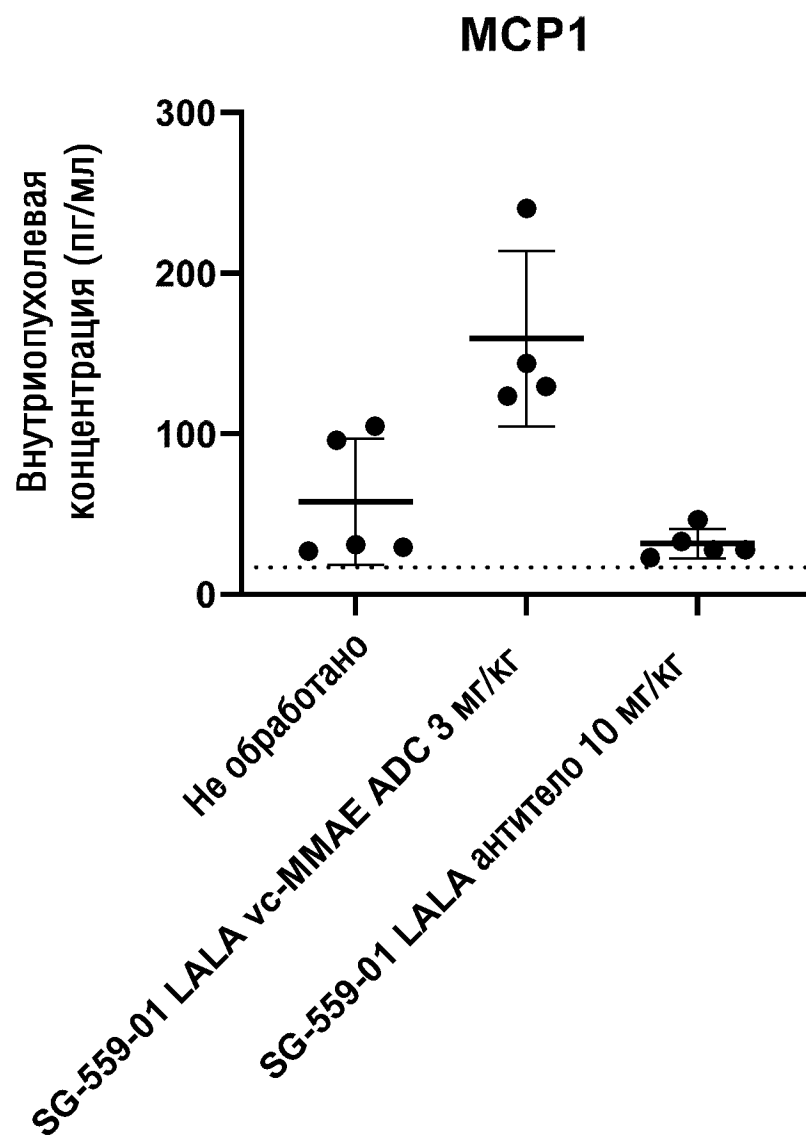
ФИГ.14С



ФИГ.14D



ФИГ.14Е



ФИГ.14F

