

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 043231

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.28

(21) Номер заявки
202091590

(22) Дата подачи заявки
2019.03.29

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

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

(31) PCT/CN2018/081079

(32) 2018.03.29

(33) CN

(43) 2021.01.21

(86) PCT/CN2019/080458

(87) WO 2019/185029 2019.10.03

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

(72) Изобретатель:
Фан Лэй, Ван Юнцян, Ван Чжэньи,
Гуо Бинши, Цзан Цзинъу (CN)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) CN-A-105777906
WO-A1-2016000619
CN-A-107488229
WO-A1-2017118321

(57) Предложены антитела против PD-L1 или их фрагменты. Указанные антитела или их фрагменты специфически связываются с иммуноглобулиновым С-доменом белка PD-L1. В различных примерах указанные антитела или их фрагменты включают VH CDR1 из SEQ ID NO: 1, VH CDR2 из SEQ ID NO: 116, VH CDR3 из SEQ ID NO: 117, VL CDR1 из SEQ ID NO: 4, VL CDR2 из SEQ ID NO: 5 и VL CDR3 из SEQ ID NO: 6 или варианты каждого из перечисленных. Также предложены способы применения указанных антител или их фрагментов для лечения и диагностики заболеваний, таких как рак и инфекционные заболевания.

B1

043231

043231

B1

Область техники

Лиганд запрограммированной смерти 1 (PD-L1), также известный как кластер дифференцировки 274 (CD274) или гомолог B7 1 (B7-H1), представляет собой трансмембранный белок 1 типа размером 40 кДа, предположительно играющий значительную роль в подавлении иммунной системы при специфических событиях, таких как беременность, аллотрансплантация тканей, аутоиммунное заболевание и другие болезненные состояния, такие как гепатит. При связывании PD-L1 с PD-1 или B7.1 происходит передача ингибиторного сигнала, который снижает пролиферацию CD8⁺ Т-клеток в лимфатических узлах; помимо этого, PD-1 также способен контролировать аккумуляцию специфических в отношении чужеродных антигенов Т-клеток в лимфатических узлах за счет апоптоза, который дополнительно опосредован меньшей регуляцией гена Bcl-2.

Было показано, что положительная регуляция PD-L1 может позволять раку ускользать от иммунной системы хозяина. Анализ образцов опухолей от пациентов с почечноклеточным раком показал, что высокая экспрессия PD-L1 в опухолях ассоциирована с повышенной агрессивностью опухоли и повышенным риском смерти. Многие ингибиторы PD-L1 находятся в разработке для иммуноонкологической терапии и демонстрируют хорошие результаты в клинических испытаниях.

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

Краткое описание изобретения

Согласно настоящему изобретению предложены антитела против PD-L1, обладающие высокой аффинностью связывания с белками PD-L1 человека и способные эффективно блокировать взаимодействие между PD-L1 и его рецептором PD-1. Важно также, что приведенные примеры демонстрируют стимуляцию указанными антителами против PD-L1 Т-клеточного иммунного ответа и ингибирование роста опухолей. В отличие от известных антител против PD-L1, которые связываются с иммуноглобулиновым V-доменом внеклеточной части белка PD-L1, указанные антитела связываются с иммуноглобулиновым C-доменом, в частности, остатками аминокислот Y134, K162 и N183. Указанные антитела против PD-L1 подходят для применения в терапевтических целях, например, при лечении различных типов рака, а также инфекций, и могут также применяться для диагностических и прогностических целей.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен(о) антитело против PD-L1 или его фрагмент, которое (который) может специфически связываться с иммуноглобулиновым C-доменом (Ig C) белка лиганда запрограммированной смерти 1 (PD-L1) человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный IgC-домен состоит из остатков аминокислот 133-225. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или указанный фрагмент антитела может связываться по меньшей мере с одним из остатков аминокислот Y134, K162 или N183 белка PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или указанный фрагмент антитела может связываться по меньшей мере с одним из остатков аминокислот Y134, K162 и N183 белка PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или указанный фрагмент антитела не связывается с иммуноглобулиновым V-доменом (Ig V) белка PD-L1, причем указанный IgV-домен состоит из остатков аминокислот 19-127.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен(о) антитело против PD-L1 или его фрагмент, отличающийся тем, что указанное антитело или указанный фрагмент антитела обладает специфичностью в отношении белка лиганда запрограммированной смерти 1 (PD-L1) человека и содержит VH CDR1 из SEQ ID NO: 1, VH CDR2 из SEQ ID NO: 2, VH CDR3 из SEQ ID NO: 3, VL CDR1 из SEQ ID NO: 4, VL CDR2 из SEQ ID NO: 5 и VL CDR3 из SEQ ID NO: 6. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или указанный фрагмент антитела дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, константную область легкой цепи, Fc-область или комбинацию перечисленного. Согласно некоторым вариантам реализации указанная константная область легкой цепи представляет собой константную область цепи каппа или лямбда. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или указанный фрагмент антитела относится к изотипу IgG, IgM, IgA, IgE или IgD. Согласно некоторым вариантам реализации указанный изотип представлен IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Без ограничений, указанное антитело или его фрагмент представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело. Согласно одному аспекту антитело или его фрагмент представляет собой гуманизированное антитело.

Согласно настоящему изобретению с применением мутагенеза дополнительно были идентифицированы горячие точки для мутаций остатков в VH CDR3 (см., например, антитела A1, A2, C3, C4, C6, B1 и B6 в примерах 13-17) и VL CDR3 (см., например, антитела B3, C4 и A3 в примерах 13-17). Соответственно, согласно настоящему изобретению также предложены антитела, включающие одну или более мута-

ций в указанных горячих точках.

Согласно некоторым вариантам реализации предложен(о) антители или его фрагмент, отличающееся или отличающийся тем, что указанное антители или указанный фрагмент антителя обладает специфичностью в отношении белка PD-L1 человека и содержит

(a) VH CDR1, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1 или варианте SEQ ID NO: 1, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 1;

(b) VH CDR2, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 116 или варианте SEQ ID NO: 116, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 116;

(c) VH CDR3, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 117 или варианте SEQ ID NO: 117, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 117, при этом второй остаток аминокислоты VH CDR3 представляет собой Leu;

(d) VL CDR1, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 4 или варианте SEQ ID NO: 4, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 4;

(e) VL CDR2, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5 или варианте SEQ ID NO: 5, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 5; и

(f) VL CDR3, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6 или варианте SEQ ID NO: 6, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 6.

Согласно одному варианту реализации указанная VH CDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1, указанная VH CDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 116, указанная VH CDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 117, указанная VL CDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 4, указанная VL CDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5, а указанная VL CDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6.

Согласно одному варианту реализации указанное антители или указанный фрагмент антителя содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 149, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 150.

Также согласно одному варианту реализации предложен(о) антители или его фрагмент, отличающееся или отличающийся тем, что указанное антители или указанный фрагмент антителя обладает специфичностью в отношении белка PD-L1 человека и содержит

(a) VH CDR1, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1 или варианте SEQ ID NO: 1, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 1;

(b) VH CDR2, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 116 или варианте SEQ ID NO: 116, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 116;

(c) VH CDR3, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 3 или варианте SEQ ID NO: 3, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 3;

(d) VL CDR1, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 4 или варианте SEQ ID NO: 4, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 4;

(e) VL CDR2, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5 или варианте SEQ ID NO: 5, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 5; и

(f) VL CDR3, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 140 или варианте SEQ ID NO: 140, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 140,

при этом по меньшей мере

(i) остаток аминокислоты 4 в VL CDR3 представляет собой Ser,

(ii) остаток аминокислоты 5 в VL CDR3 представляет собой Asp, или

(iii) остаток аминокислоты 6 в VL CDR3 представляет собой Ala.

Согласно одному варианту реализации указанная VH CDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1, указанная VH CDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 116, указанная VH CDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 3, указанная VL CDR1 содержит последовательность аминокислот, пред-

ставленную в SEQ ID NO: 4, указанная VL CDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5, а указанная VL CDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 140.

Согласно одному варианту реализации указанное антитело или указанный фрагмент антитела содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 159, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 160.

Согласно одному варианту реализации предложен(о) антитело или его фрагмент, отличающееся или отличающийся тем, что указанное антитело или указанный фрагмент антитела обладает специфичностью в отношении белка PD-L1 человека и содержит

(a) VH CDR1, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1 или варианте SEQ ID NO: 1, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 1;

(b) VH CDR2, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 116 или варианте SEQ ID NO: 116, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 116;

(c) VH CDR3, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 3 или варианте SEQ ID NO: 3, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 3;

(d) VL CDR1, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 4 или варианте SEQ ID NO: 4, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 4;

(e) VL CDR2, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5 или варианте SEQ ID NO: 5, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 5; и

(f) VL CDR3, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6 или варианте SEQ ID NO: 6, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 6.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная VH CDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1, указанная VH CDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 116, указанная VH CDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 3, указанная VL CDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 4, указанная VL CDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5, а указанная VL CDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или указанный фрагмент антитела содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 141, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 142.

Также согласно некоторым вариантам реализации предложена композиция, содержащая антитело или его фрагмент согласно настоящему описанию, и фармацевтически приемлемый носитель. Дополнительно согласно некоторым вариантам реализации предложена выделенная клетка, содержащая один или более полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент согласно настоящему описанию.

Также предложены способы лечения и варианты применения. Согласно одному варианту реализации предложен способ лечения рака или инфекции у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту эффективного количества антитела или его фрагмента согласно настоящему описанию. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой солидную опухоль. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака печени, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака эндометрия, лейкоза, лимфомы, рака поджелудочной железы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака уретры, рака головы и шеи, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака пищевода, рака яичников, рака почек, меланомы, рака предстательной железы и рака щитовидной железы. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака печени, рака поджелудочной железы, немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака уретры, рака ободочной и прямой кишки, рака головы и шеи, плоскоклеточного рака, карциномы из клеток Меркеля, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака пищевода, рака яичников, рака почек и мелкоклеточного рака легкого. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ дополнительно включает введение указанному пациенту второго агента для терапии рака. Согласно некоторым вариантам реализации указанная инфекция представляет собой вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, микотическую инфекцию или паразитарную инфекцию.

Согласно другому варианту реализации предложен способ лечения рака или инфекции у нуждающегося в этом пациента, включающий

- (a) обработку клетки *in vitro* антителом или его фрагментом согласно настоящему описанию; и
- (b) введение обработанной клетки указанному пациенту.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ дополнительно включает выделение указанной клетки из организма индивидуума перед этапом (a). Согласно некоторым вариантам реализации указанную клетку выделяют из организма пациента. Согласно некоторым вариантам реализации указанную клетку выделяют из организма индивидуума-донора, не являющегося пациентом. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка представляет собой Т-клетку, неограничивающие примеры которой включают инфильтрирующий опухоль Т-лимфоцит, CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку или комбинацию перечисленного.

Также предложены способы диагностики и варианты применения. Согласно одному варианту реализации предложен способ детекции экспрессии PD-L1 в образце, включающий приведение указанного образца в контакт с антителом или его фрагментом в условиях, позволяющих указанному антителу или его фрагменту связываться с PD-L1, и детекцию указанного связывания, которое указывает на экспрессию PD-L1 в образце. Согласно некоторым вариантам реализации указанный образец содержит опухолевую клетку, опухолевую ткань, инфицированную ткань или образец крови.

Антитела и фрагмент согласно настоящему описанию могут применяться для получения биспецифических антител. Согласно одному варианту реализации предложено биспецифическое антитело, содержащее фрагмент согласно настоящему описанию и второй антигенсвязывающий фрагмент, обладающий специфичностью в отношении молекулярной структуры на иммунной клетке. Согласно некоторым вариантам реализации указанная молекула выбрана из группы, состоящей из PD-1, CTLA-4, LAG-3, CD28, CD122, 4-1BB, TIM3, OX-40, OX40L, CD40, CD40L, LIGHT, ICOS, ICOSL, GITR, GITRL, TIGIT, CD27, VISTA, B7H3, B7H4, HEVМ или BTLA, CD47 и CD73. Согласно некоторым вариантам реализации и указанный фрагмент, и второй фрагмент независимо выбраны из Fab-фрагмента, одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) или однодоменного антитела. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело дополнительно содержит Fc-фрагмент.

Краткое описание чертежей

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

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

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

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

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

На фиг. 6 показано, что все протестированные гуманизированные антитела обладали сопоставимой эффективностью связывания с PD-L1 человека в контакте с химерным антителом.

На фиг. 7 показано, что все протестированные гуманизированные антитела могут высокоэффективно связываться с PD-L1, экспрессируемым на клетках млекопитающих, сопоставимо с химерным антителом.

На фиг. 8 показано, что гуманизированное антитело Hu1210-41 способно связываться с PD-L1 макака-резуса с меньшей аффинностью и не способно связываться с PD-L1 крысы и мыши.

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

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

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

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

На фиг. 13 показано, что гуманизированные антитела Hu1210-40, Hu1210-41 и Hu1210-17 могут дозозависимым образом стимулировать продуцирование ИФН-γ в анализе с панелью антигенов CMV.

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

На фиг. 15 показано, что антитело Hu1210-41 может дозозависимым образом ингибировать рост опухоли в модели ксенотрансплантата HCC827-NSG, при этом антитело Hu1210-41 также дозозависимым образом снижало массу опухоли.

На графиках на фиг. 16 для каждого мутанта PD-L1 представлено среднее значение связывания как функция от экспрессии (реактивность контрольного моноклонального антитела (mAb) против PD-L1).

Фиг. 17 иллюстрирует локализацию Y134, K162 и N183, остатков (сфер), вовлеченных в связывание с антителом против PD-L1 Hu1210-41.

На фиг. 18 приведено сравнение мутанта S60R с исходным антителом Hu1210-41 применительно к эффективности связывания с PD-L1, экспрессируемым на клетках млекопитающих.

На фиг. 19 представлены результаты анализа связывания (с PD-L1 человека) для полученных антител.

На фиг. 20 показано, что антитело B6 с большей эффективностью связывалось с PD-L1, экспрессируемым на клетках млекопитающих, по сравнению с исходным антителом и тецентриком (Tecentriq™, атезолизумаб).

На фиг. 21 показан эффект указанных антител на продуцирование ИЛ-2 в клетках Jurkat, в которых B6 также демонстрировал более высокую активность.

На фиг. 22 представлена стимулирующая продуцирование ИФН-γ активность антител *in vitro* в условиях смешанной культуры лимфоцитов.

На фиг. 23 представлена ингибирующая рост опухоли активность антител *in vivo*.

Подробное описание изобретения

Определения.

Следует отметить, что термины в единственном числе относятся к одной или более единицам указанного объекта; например, "антитело" соответствует одному или более антителам. Соответственно термины в единственном числе, выражения "один или более" и "по меньшей мере один" могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо.

В настоящем документе термин "полипептид" охватывает единственный "полипептид", а также множество "полипептидов", и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно соединенных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" относится к любой цепи или цепям из двух или более аминокислот, и не относится к конкретной длине продукта. Соответственно пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белок", "аминокислотная цепь" или любой другой термин, относящийся к цепи или цепям из двух или более аминокислот, включены в определение "полипептида", и термин "полипептид" может использоваться вместо любого из приведенных терминов или взаимозаменяемо с любым из них. Термин "полипептид" также относится к продуктам постэкспрессионных модификаций полипептида, в том числе, без ограничения, гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления или модификации с не встречающимися в природе аминокислотами. Полипептид может происходить из естественного биологического источника или быть получен с применением рекомбинантной технологии, однако не обязательно транслирован с указанной последовательности нуклеиновой кислоты. Он может быть получен любым способом, в том числе путем химического синтеза.

Термин "выделенные" в настоящем документе применительно к клеткам, нуклеиновым кислотам, таким как ДНК или РНК, относится к молекулам, отделенным от других ДНК или РНК соответственно, которые присутствуют в естественном источнике указанной макромолекулы. Термин "выделенные" в настоящем документе также относится к нуклеиновой кислоте или пептиду, по существу не содержащей (не содержащему) клеточного материала, вирусного материала или культуральной среды при получении с применением методик рекомбинантной ДНК, или химических предшественников или других химических веществ, если они были химически синтезированы. Кроме того, термин "выделенная нуклеиновая кислота" включает фрагменты нуклеиновой кислоты, не встречающиеся в природе в виде фрагментов и не обнаруживаемые в естественном состоянии. Термин "выделенные" также используют в настоящем документе для обозначения клеток или полипептидов, которые отделены от других клеточных белков или тканей. Подразумевается, что к выделенным полипептидам относятся как очищенные, так и рекомбинантные полипептиды.

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

"Гомология", или "идентичность", или "сходство" относится к сходству последовательностей двух пептидов или между двумя молекулами нуклеиновой кислоты. Гомология может быть определена путем сравнения положения в каждой последовательности, выравнивание которой может быть проведено для целей сравнения. Если положение в сравниваемой последовательности занято тем же основанием или аминокислотой, то молекулы гомологичны в указанном положении. Степень гомологии между последовательностями представляет собой функцию от числа совпадающих или гомологичных положений в последовательностях. "Неродственная" или "негомологичная" последовательность характеризуется менее чем 40% идентичностью, но предпочтительно менее чем 25% идентичностью одной из последовательностей согласно настоящему описанию.

Если полинуклеотид или область полинуклеотида (или полипептид или область полипептида) характеризуется определенным процентом (например, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%) "идентичности последовательностей" другой последовательности, это означает, что после выравнивания при

сравнении двух последовательностей они содержат указанный процент идентичных оснований (или аминокислот). Указанные выравнивание и процент гомологии или идентичности последовательностей могут быть определены с применением программного обеспечения, известного в данной области техники, например, описанного в источнике: Ausubel et al. eds. (2007), *Current Protocols in Molecular Biology*. Для выравнивания предпочтительно используют установленные по умолчанию параметры. Одной из программ для выравнивания является BLAST с установленными по умолчанию параметрами. В частности, программы представлены BLASTN и BLASTP со следующими установленными по умолчанию параметрами:

генетический код=стандартный;
 фильтр=без фильтра;
 цепь=обе цепи;
 значение отсечения=60;
 ожидание=10;
 матрица=BLOSUM62;
 описания=50 последовательностей;
 сортировка=по наивысшему показателю (HIGH SCORE);
 базы данных=неизбыточные, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+транслированные последовательности CDS GenBank+SwissProtein+SPupdate+PIR.

Биологически эквивалентные полинуклеотиды представляют собой нуклеотиды, характеризующиеся вышеуказанным процентом гомологии и кодирующие полипептид, обладающий такой же или аналогичной биологической активностью.

Термин "эквивалентная нуклеиновая кислота или эквивалентный полинуклеотид" относится к нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность нуклеотидов, характеризующуюся определенной степенью гомологии или идентичности последовательности нуклеотидов указанной нуклеиновой кислоты или ее комплемента. Предполагается, что гомолог двуцепочечной нуклеиновой кислоты включает нуклеиновые кислоты, имеющие последовательность нуклеотидов, характеризующуюся определенной степенью гомологии указанной нуклеиновой кислоте или ее комплементу. Согласно одному аспекту гомологии нуклеиновых кислот способны гибридизоваться с указанной нуклеиновой кислотой или ее комплементом. Сходным образом, "эквивалентный полипептид" относится к полипептиду, характеризующемуся определенной степенью гомологии или идентичности последовательностей относительно последовательности аминокислот референсного полипептида. Согласно некоторым аспектам идентичность последовательностей составляет по меньшей мере приблизительно 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%. Согласно некоторым аспектам эквивалентный полипептид или полинуклеотид содержит 1, 2, 3, 4 или 5 добавлений, делеций, замен и их комбинаций по сравнению с референсным полипептидом или полинуклеотидом. Согласно некоторым аспектам эквивалентная последовательность сохраняет активность (например, эпиген-связывающую) или структуру (например, солевые мостики) референсной последовательности.

Реакции гибридизации могут быть проведены в условиях разной "жесткости". В общем случае, реакцию гибридизации в условиях низкой жесткости проводят при приблизительно 40°C в приблизительно 10×SSC или в растворе с эквивалентной ионной силой/температурой. Гибридизацию в условиях умеренной жесткости, как правило, проводят при приблизительно 50°C в приблизительно 6×SSC, и реакцию гибридизации в условиях высокой жесткости, как правило, проводят при приблизительно 60°C в приблизительно 1×SSC. Реакции гибридизации могут также быть проведены в "физиологических условиях", хорошо известных специалисту в данной области техники. Неограничивающий пример физиологических условий представлен температурой, ионной силой, pH и концентрацией Mg^{2+} , обычно обнаруживаемых в клетке.

Полинуклеотид состоит из конкретной последовательности из четырех нуклеотидных оснований: аденина (A); цитозина (C); гуанина (G); тимина (T); и урацила (U) вместо тимина в случае полинуклеотида РНК. Соответственно термин "последовательность полинуклеотидов" обозначает буквенное представление молекулы полинуклеотида. Указанное буквенное представление может быть введено в базы данных в компьютере, имеющем центральный процессор и используемый для биоинформационных приложений, таких как функциональная геномика и поиск гомологии. Термин "полиморфизм" относится к сосуществованию более чем одной формы гена или его части. Часть гена, имеющего по меньшей мере две разные формы, т.е. представленная двумя разными последовательностями нуклеотидов, называется "полиморфной областью гена". Полиморфная область может представлять собой одиночный нуклеотид, разный в разных аллелях.

Термины "полинуклеотид" и "олигонуклеотид" используются взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов, или их аналогов. Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Неограничивающие примеры полинуклеотидов представлены: геном или или фрагментом гена (например, зондом, праймером, меткой EST или SAGE), экзонами, интронами, матричной РНК (мРНК), транспортной РНК, рибосомальной РНК, рибозимами, кДНК, дцРНК, миРНК,

миРНК, рекомбинантными полинуклеотидами, разветвленными полинуклеотидами, плазмидами, векторами, выделенными ДНК с любой последовательностью, выделенными РНК с любой последовательностью, нуклеиновокислотными зондами и праймерами. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов. При наличии модификаций в структуре нуклеотида они могут быть осуществлены до или после сборки полинуклеотида. Последовательность нуклеотидов могут прерывать ненуклеотидные компоненты. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, например, путем конъюгации с компонентом для мечения. Также указанный термин относится как к двуцепочечным, так и к одноцепочечным молекулам. Если не указано или не требуется иное, любой вариант реализации настоящего изобретения, предусматривающий полинуклеотид, охватывает и двуцепочечную форму, и каждую из двух образующих двуцепочечную форму комплементарных одноцепочечных форм, известных или предсказанных.

Термин "кодировать" применительно к полинуклеотидам относится к полинуклеотиду, который, как указано, "кодирует" полипептид, если он в естественном состоянии или после проведения манипуляций с применением способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, может быть транскрибирован и/или транслирован с получением мРНК полипептида и/или его фрагмента. Антисмысловая цепь представляет собой комплемент такой нуклеиновой кислоты, и кодирующая последовательность может быть из нее выведена.

В настоящем документе "антитело" или "антигенсвязывающий полипептид" относится к полипептиду или полипептидному комплексу, который специфически распознает и связывает антиген. Антитело может представлять собой полное антитело и любой его антигенсвязывающий фрагмент или одиночную цепь. Соответственно термин "антитело" включает любую содержащую белок или пептид молекулу, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, обладающую биологической активностью, заключающейся в связывании с антигеном. Примеры таких молекул включают, не ограничиваясь перечисленным, определяющую комплементарность область (CDR) тяжелой или легкой цепи или ее лигандсвязывающую часть, вариабельную область тяжелой цепи или легкой цепи, константную область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасную (FR) область или любую ее часть, или по меньшей мере одну часть связывающего белка.

Термины "фрагмент антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент" в настоящем документе относятся к части антитела, такой как $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , Fv , $scFv$ и т.п. Независимо от структуры, фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, что и распознаваемый интактным антителом. Термин "фрагмент антитела" включает аптамеры, шпигельмеры и диатела. Термин "фрагмент антитела" также включает любой синтетический или генетически сконструированный белок, который действует как антитело, связывая специфический антиген с образованием комплекса.

"Одноцепочечный вариабельный фрагмент", или " $scFv$ " относится к слитому белку из вариабельных областей тяжелых (V_H) и легких цепей (V_L) иммуноглобулинов. Согласно некоторым аспектам указанные области соединены коротким линкерным пептидом длиной от 10 до приблизительно 25 аминокислот. Указанный линкер может быть обогащен глицином для гибкости, а также серином или треонином для растворимости, и может соединять либо N-конец V_H с C-концом V_L , либо наоборот. Указанный белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкера. Молекулы $ScFv$ известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 5892019.

Термин "антитело" охватывает различные широкие классы полипептидов, которые можно различить с помощью биохимических методов. Специалистам в данной области техники будет понятно, что тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon (γ , μ , α , δ , ϵ), включающие некоторые подклассы (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Природа указанной цепи и определяет "класс" антитела как IgG , IgM , IgA , IgG или IgE , соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 , IgG_4 , IgG_5 и т.п., подробно описаны, и известно, что они обеспечивают функциональную специализацию. Специалист сможет легко определить модифицированные варианты каждого из указанных классов и изотипов после ознакомления с настоящим описанием и, соответственно, такие варианты входят в объем настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов явным образом включены в объем настоящего изобретения; описание ниже в основном относится к классу IgG молекул иммуноглобулинов. В случае IgG стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи с молекулярной массой, равной приблизительно 23000 Да, и два идентичных полипептида тяжелой цепи с молекулярной массой, равной 53000-70000. Указанные четыре цепи, как правило, соединены дисульфидными связями в "Y"-образной конфигурации, причем легкие цепи охватывают тяжелые цепи, начинаясь в области "выреза" буквы "Y" и проходя через вариабельную область.

Антитела, антигенсвязывающие полипептиды, их варианты или производные согласно настоящему описанию включают, не ограничиваясь перечисленными, поликлональные, моноклональные, мультиспецифические, человеческие, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитоп-связывающие фрагменты, например, Fab , Fab' и $F(ab')_2$, Fd , Fv , одноцепочечные Fv ($scFv$), одноцепочечные антитела, связанные дисульфидными связями Fv ($sdFv$), фрагменты, содер-

жащие VK- или VH-домен, фрагменты, продуцированные экспрессионной библиотекой Fab; и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id-антитела к антителам LIGHT согласно описанию в настоящем документе). Молекулы иммуноглобулинов или антител 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 иммуноглобулинов.

Легкие цепи классифицируют как каппа или лямбда (κ , λ). Любой класс тяжелых цепей может быть связан либо с легкой цепью каппа, либо с легкой цепью лямбда. В целом, легкие и тяжелые цепи ковалентно связаны друг с другом, и "хвосты" двух тяжелых цепей соединены между собой ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями при продуцировании иммуноглобулинов как гибридомами, так и В-клетками или генетически сконструированными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи последовательности аминокислот идут от N-конца на раздвоенной части Y-образной конфигурации к C-концу внизу каждой цепи.

И легкие, и тяжелые цепи разделены на области структурной и функциональной гомологии. Термины "константный" и "вариабельный" используют функционально. В этом смысле следует понимать, что части вариабельных доменов и легких (VK), и тяжелых (VH) цепей определяют распознавание антигена и антигенспецифичность. И напротив, константные домены легкой цепи (СК) и тяжелой цепи (СН1, СН2 или СН3) обеспечивают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная мобильность, связывание Fc-рецептора, связывание комплемента и т.п. Условно считается, что нумерация константной области доменов увеличивается по мере удаления от сайта связывания антигена или аминоконца антитела. N-концевая часть представляет собой вариабельную область, а C-концевая часть представляет собой константную область; домены СН3 и СК фактически содержат карбоксильный конец тяжелой и легкой цепи, соответственно.

Как указано выше, вариабельная область позволяет антителу селективно распознавать и специфически связывать эпитопы на антигенах. То есть VK-домен и VH-домен, или подгруппа определяющих комплементарность областей (CDR) антитела скомбинированы таким образом, чтобы формировать вариабельную область, определяющую трехмерный сайт связывания антигена. Указанная четвертичная структура антитела образует сайт связывания антигена, присутствующий на конце каждого плеча Y. Конкретнее, сайт связывания антигена определен тремя CDR на каждой из цепей VH и VK (т.е. CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3). В некоторых случаях например, в случае определенных молекул иммуноглобулина, происходящих из вида верблюдовых или сконструированных на основе иммуноглобулинов верблюдовых, полная молекула иммуноглобулина может состоять исключительно из тяжелых цепей, без легких цепей. См., например, Hamers-Casterman et al., *Nature*, 363:446-448 (1993).

Во встречающихся в природе антителах шесть "определяющих комплементарность областей", или "CDR", присутствующих в любом антигенсвязывающем домене, представлены короткими, не расположенными непрерывно последовательностями аминокислот, расположенным специфическим образом, чтобы формировать антигенсвязывающий домен при принятии антителом его трехмерной конфигурации в водной среде. Остальные аминокислоты в антигенсвязывающих доменах, называемые "каркасными" областями, проявляют меньшую межмолекулярную вариабельность. Каркасные области в основном принимают β -складчатую конформацию, а области CDR образуют петли, которые соединяют указанную β -складчатую структуру и в некоторых случаях входят в ее состав. Соответственно каркасные области образуют скаффолд, который обеспечивает позиционирование областей CDR в корректной ориентации за счет межцепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен образованный указанными позиционированными CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу на иммунореактивном антигене. Указанная комплементарная поверхность способствует нековалентное связывание антитела с когнатным эпитопом. Аминокислоты, содержащие области CDR и каркасные области, в любой вариабельной области тяжелой или легкой цепи, соответственно, могут быть легко идентифицированы специалистом в данной области техники, поскольку они были точно определены (см. источники "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., et al., U.S., Department of Health and Human Services, (1983); и Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)).

В том случае, если для термина, который используется и/или принят в данной области техники, имеется два или более определений, определение термина в настоящем документе включает все такие значения, если явным образом не указано иное. Конкретный пример представлен использованием термина "определяющая комплементарность область" ("CDR") для описания не расположенных непрерывно антигенсвязывающих сайтов, обнаруживаемых в вариабельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. Указанная конкретная область была описана Kabat с соавторами и Chothia с соавторами в источниках: Kabat et al., U.S., Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983); и Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987), которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылок. При сравнении определения CDR по Kabat и по Chothia включают перекрывающиеся остатки или подгруппы остатков аминокислот. Тем не менее, использование любого из определений для CDR антитела или его вариантов охвачено термином, определенным и используемым в настоящем документе. Подходящие остатки аминокислот, которые включают области CDR со-

гласно каждому из указанных выше источников, приведены в таблице ниже для сравнения. Точные количества остатков, включающих конкретную CDR, варьируют в зависимости от последовательности и размера указанной CDR. Специалисты в данной области техники могут рутинными способами определить остатки, которые содержат конкретную область CDR, на основании последовательности аминокислот вариабельной области антитела.

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

Kabat с соавторами также определили систему нумерации последовательностей вариабельных доменов, которая применима к любому антителу. Специалист в данной области техники может однозначным образом применить указанную систему "нумерации по Kabat" к любой последовательности вариабельного домена, не полагаясь на какие-либо экспериментальные данные, помимо собственно последовательности. В настоящем документе "нумерация по Kabat" относится к системе нумерации, описанной в источнике: Kabat et al., U.S., Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983).

Наряду с таблицей выше система нумерации по Kabat описывает области CDR следующим образом: CDR-H1 начинается приблизительно с аминокислоты 31 (т.е. приблизительно через 9 остатков после первого остатка цистеина), включает приблизительно 5-7 аминокислот и заканчивается на следующем остатке триптофана. CDR-H2 начинается с 15-го остатка за концом CDR-H1, включает приблизительно 16-19 аминокислот и заканчивается на следующем остатке аргинина или лизина. CDR-H3 начинается приблизительно с 33 остатка аминокислоты за концом CDR-H2; включает 3-25 аминокислот; и заканчивается на последовательности W-G-X-G, где X - любая аминокислота. CDR-L1 начинается приблизительно с остатка 24 (т.е. за остатком цистеина); включает приблизительно 10-17 остатков; и заканчивается на следующем остатке триптофана. CDR-L2 начинается приблизительно с 16-го остатка за концом CDR-L1 и включает приблизительно 7 остатков. CDR-L3 начинается приблизительно с 33-го остатка за концом CDR-L2 (т.е. за остатком цистеина); включает приблизительно 7-11 остатков и заканчивается на последовательности F или W-G-X-G, где X - любая аминокислота.

Антитела согласно описанию в настоящем документе могут происходить из любых животных, в том числе птиц и млекопитающих. Предпочтительно указанные антитела представляют собой антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. Согласно другому варианту реализации вариабельная область может происходить из хрящевых рыб (например, от акул).

В настоящем документе термин "константная область тяжелой цепи" включает последовательности аминокислот, происходящие из тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий константную область тяжелой цепи, содержит по меньшей мере что-либо одно из домена СН1, шарнирного домена (например, верхней, средней и/или нижней шарнирной области), домена СН2, домена СН3, или варианта или фрагмента перечисленного. Например, антигенсвязывающий полипептид для применения согласно настоящему изобретению может содержать полипептидную цепь, содержащую домен СН1; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен СН2; полипептидную цепь, содержащую домен СН1 и домен СН3; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен СН3, или полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена, домен СН2 и домен СН3. Согласно другому варианту реализации полипептид согласно настоящему описанию содержит полипептидную цепь, содержащую домен СН3. Кроме того, в антителе для применения согласно настоящему изобретению может отсутствовать по меньшей мере часть домена СН2 (например, весь домен или часть домена СН2). Как описано выше, специалисту в данной области техники будет понятно, что константная область тяжелой цепи может быть модифицирована таким образом, что она отличается последовательностью аминокислот от последовательности во встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина.

Константная область тяжелой цепи антитела согласно описанию в настоящем документе может происходить из разных молекул иммуноглобулина. Например, константная область тяжелой цепи полипептида может содержать домен СН1, происходящий из молекулы IgG₁, и шарнирную область, происходящую из молекулы IgG₃. Согласно другому примеру константная область тяжелой цепи может содержать шарнирную область, происходящую частично из молекулы IgG₁ и частично из молекулы IgG₃. Согласно другому примеру тяжелоцепочечная часть может содержать химерный шарнир, происходящий частично из молекулы IgG₁ и частично из молекулы IgG₄.

В настоящем документе термин "константная область легкой цепи" включает последовательности аминокислот, происходящие из легкой цепи антитела. Предпочтительно константная область легкой цепи содержит по меньшей мере что-либо одно из константного домена цепи каппа или константного до-

мена цепи лямбда.

"Пара легкая цепь/тяжелая цепь" относится к комплексу из легкой цепи и тяжелой цепи, который может формировать димер за счет дисульфидной связи между доменом CL легкой цепи и доменом CH1 тяжелой цепи.

Как было указано ранее, субъединичные структуры и трехмерная конфигурация константных областей иммуноглобулинов различных классов хорошо известны. В настоящем документе термин "VH-домен" включает аминоконцевой вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, а термин "домен CH1" включает первый (ближайший к аминоконцу) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Домен CH1 расположен смежно с VH-доменом и в направлении аминоконца относительно шарнирной области тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина.

В настоящем документе термин "домен CH2" включает часть молекулы тяжелой цепи, которая продолжается, например, приблизительно от остатка 244 до остатка 360 антитела при использовании стандартных схем нумерации (остатки 244-360, система нумерации Kabat; и остатки 231-340, система нумерации EU; см. Kabat et al., U.S., Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)). Домен CH2 уникален тем, что его тесного спаривания с другим доменом не происходит. Вместо этого между двумя доменами CH2 интактной природной молекулы IgG внедрены две N-связанных разветвленных углеводных цепи. Также убедительно подтверждено, что домен CH3 продолжается от домена CH2 до C-конца молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

В настоящем документе термин "шарнирная область" включает часть молекулы тяжелой цепи, которая соединяет домен CH1 с доменом CH2. Указанная шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и обладает гибкостью, позволяя таким образом двум N-концевым антигенсвязывающим областям независимо двигаться. Шарнирные области могут быть подразделены на три отдельных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux et al., J. Immunol., 161:4083 (1998)).

В настоящем документе термин "дисульфидная связь" включает ковалентную связь, формирующуюся между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может формировать дисульфидную связь или мостик с второй тиольной группой. В большинстве встречающихся в природе молекул IgG области CH1 и СК соединены дисульфидной связью, а две тяжелых цепи соединены двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242 при использовании системы нумерации Kabat (положение 226 или 229, система нумерации EU).

В настоящем документе термин "химерное антитело" означает любое антитело, отличающееся тем, что иммунореактивная область или сайт получен(а) или происходит из первого вида, а константная область (которая может быть интактной, частичной или быть модифицирована в соответствии с настоящим изобретением) получена из второго вида. Согласно определенным вариантам реализации целевая связывающая область или сайт происходит не из источника, полученного от человека (например, получена из мыши или примата), а константная область получена от человека.

Согласно настоящему изобретению "процент гуманизации" вычисляют путем определения числа различий аминокислот в каркасной последовательности (т.е. различий не в CDR) гуманизированного домена и домена зародышевой линии, вычитания полученного числа из общего числа аминокислот, с последующим делением результата на общее число аминокислот и умножением на 100.

Выражения "специфически связывает" или "характеризуется специфичностью в отношении" подразумевают, как правило, что антитело связывается с эпитопом посредством антигенсвязывающего домена, и что указанное связывание подразумевает некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. В соответствии с этим определением про антитело говорят, что оно "специфически связывается" с эпитопом, если оно связывается с указанным эпитопом посредством антигенсвязывающего домена легче, чем связывалось бы со случайным неродственным эпитопом. Термин "специфичность" применяют в настоящем документе для качественной оценки относительной аффинности, с которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, антитело "А" может быть сочтено имеющим более высокую специфичность в отношении заданного эпитопа по сравнению с антителом "В", или может быть указано, что антитело "А" связывается с эпитопом "С" с более высокой специфичностью, чем с родственным эпитопом "D".

В настоящем документе термины "лечить" или "лечение" относятся и к терапевтическому лечению, и к профилактическим или предупредительным мерам, причем цель заключается в предотвращении или замедлении (облегчении) нежелательного физиологического изменения или расстройства, например, прогрессирования рака. Благоприятные или требуемые клинические результаты включают, не ограничиваясь перечисленным, облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие усугубления) статуса заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или временное смягчение болезненного состояния, и ремиссию (частичную или полную), детектируемые или недетектируемые. "Лечение" может также означать увеличение длительности выживания по сравнению с ожидаемым выживанием при отсутствии лечения. Нуждающиеся в лечении включают уже имеющих указанное состояние или расстройство, а также предрасположенных к указанному состоянию или расстройству; или тех, у кого необходимо предотвратить развитие указанного состояния или расстройства.

Термин "субъект", или "индивидуум", или "животное", или "пациент", или "млекопитающее" относится к любому субъекту, в частности, субъекту-млекопитающему, которому требуется диагноз, прогноз или терапия. Субъекты - млекопитающие включают человека, домашних животных, сельскохозяйственных животных и животных в зоопарках, используемых в спорте животных или животных-компаньонов, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и т.д.

В настоящем документе такие выражения, как "пациент, нуждающийся в лечении" или "субъект, нуждающийся в лечении" включает субъектов, таких как субъекты-млекопитающие, для которых было бы благоприятным введение антитела или композиции согласно настоящему описанию, применяемых, например, для детекции, для диагностической процедуры и/или для лечения.

Антитела против PD-L1.

Согласно настоящему изобретению предложены антитела против PD-L1 с высоким сродством к белку PD-L1 человека. Протестированные антитела демонстрировали мощное связывание и ингибиторную активность, и подходят для терапевтического и диагностического применения.

Белок PD-L1 представляет собой трансмембранный белок типа 1 размером 40 кДа. Его внеклеточная часть включает N-концевой иммуноглобулиновый V-домен (IgV) (аминокислоты 19-127) и C-концевой иммуноглобулиновый C-домен (IgC) (аминокислоты 133-225). PD-1 и PD-L1 взаимодействуют через консервативные переднюю и боковую части их IgV-доменов, как и IgV-домены антител и T-клеточных рецепторов. Ожидаемым образом, все известные в настоящее время антитела против PD-L1 связываются с IgV-доменом, что может нарушать связывание между PD-1 и PD-L1. Соответственно удивительным и неожиданным было описанное в настоящем документе открытие, заключающееся в том, что антитела, например, многие антитела согласно описанию в настоящем документе, которые связываются с IgC-доменом белка PD-L1, также способны эффективно и, возможно, даже в большей степени ингибировать PD-L1, что приводит к получению еще более усовершенствованных терапевтических эффектов.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, соответственно, предложено антитело против PD-L1 или его фрагмент, способное(ый) специфически связываться с иммуноглобулиновым C-доменом (IgC) белка лиганда запрограммированной смерти 1 (PD-L1) человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный IgC-домен состоит из остатков аминокислот 133-225.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или указанный фрагмент антитела может связываться по меньшей мере с одним из остатков аминокислот Y134, K162 или N183 белка PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или указанный фрагмент антитела может связываться по меньшей мере с двумя из остатков аминокислот Y134, K162 или N183 белка PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или указанный фрагмент антитела может связываться по меньшей мере с одним из остатков аминокислот Y134, K162 и N183 белка PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или указанный фрагмент антитела не связывается с иммуноглобулиновым V-доменом (IgV) белка PD-L1, причем указанный IgV-домен состоит из остатков аминокислот 19-127.

В соответствии с одним вариантом реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое включает вариабельные домены тяжелых цепей и легких цепей с областями CDR, определенными в SEQ ID NO: 1-6.

Таблица 1

Последовательности областей CDR

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH CDR1	<u>SYDMS</u>	1
VH CDR2	<u>TISDGGGYIYSDSVKG</u>	2
VH CDR3	<u>EFGKRYALDY</u>	3
VL CDR1	<u>KAQDVT</u> PAVA	4
VL CDR2	<u>STSSRYT</u>	5
VL CDR3	<u>QQHYTTPLT</u>	6

Как было продемонстрировано на экспериментальных примерах, антитела, содержащие указанные области CDR - как антитела мыши, так и гуманизированные или химерные - демонстрировали выраженное связывание PD-L1 и ингибиторную активность. С применением дополнительного компьютерного моделирования было показано, что определенные остатки в пределах CDR могут быть модифицированы для сохранения или улучшения свойств антител. Такие остатки, которые выделены подчеркиванием в табл. 1, называются "горячими точками". Согласно некоторым вариантам реализации антитело против PD-L1 согласно настоящему описанию включает VH и VL CDR, представленные в табл. 1, с одной, двумя или тремя дополнительными модификациями. Такие модификации могут представлять собой добавления, делецию или замену аминокислот.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная модификация представляет собой замену не более чем в одной горячей точке в каждой из CDR. Согласно некоторым вариантам реализации указанная модификация представляет собой замену в одной, двух или трех таких горячих точках. Согласно одному варианту реализации указанная модификация представляет собой замену в одной из горячих точек.

Такие замены, согласно некоторым вариантам реализации, представляют собой консервативные замены.

"Консервативная замена аминокислоты" представляет собой такую замену, при которой остаток аминокислоты заменяют на остаток аминокислоты, содержащей аналогичную боковую цепь. В данной области техники были определены семейства остатков аминокислот, содержащих аналогичные боковые цепи, в том числе основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Соответственно остаток заменимой аминокислоты в иммуноглобулиновом полипептиде предпочтительно заменяют на другой остаток аминокислоты из того же семейства боковых цепей. Согласно другому варианту реализации отрезок последовательности аминокислот может быть заменен на структурно аналогичный отрезок, отличающийся порядком и/или составом представителей семейства боковых цепей.

Неограничивающие примеры консервативных замен аминокислот приведены в таблице ниже, при этом показатель сходства, равный 0 или более, указывает на консервативную замену между двумя аминокислотами.

Таблица 2

Матрица сходства аминокислот

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

Таблица 3

Консервативные замены аминокислот

Заменяемая аминокислота:	Замена на
Аланин	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
Аргинин	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
Аспарагин	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
Аспарагиновая кислота	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Цистеин	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
Глутамин	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Глутаминовая кислота	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Глицин	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala
Изолейцин	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Лейцин	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
Лизин	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
Метионин	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Фенилаланин	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
Пролин	D-Pro
Серин	D-Ser, Thr, D-Thr, алло-Thr, L-Cys, D-Cys
Треонин	D-Thr, Ser, D-Ser, алло-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
Тирозин	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
Валин	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

Конкретные примеры CDR с подходящими заменами представлены в SEQ ID NO: 61-111 из примера 11. Согласно некоторым вариантам реализации, соответственно, антитело согласно настоящему описанию включает VH CDR1 из последовательности SEQ ID NO: 1 или любой из последовательностей 61-67. Согласно некоторым вариантам реализации антитело согласно настоящему описанию включает VH CDR2 из SEQ ID NO: 2 или любой из 68-77. Согласно некоторым вариантам реализации антитело согласно настоящему описанию включает VH CDR3 из SEQ ID NO: 1 или любой из последовательностей 78-90. Согласно некоторым вариантам реализации антитело согласно настоящему описанию включает VL CDR1 из SEQ ID NO: 4 или любой из последовательностей 91-92. Согласно некоторым вариантам реализации антитело согласно настоящему описанию включает VL CDR2 из SEQ ID NO: 5 или любой из последовательностей 93-105. Согласно некоторым вариантам реализации антитело согласно настоящему описанию включает VL CDR3 из SEQ ID NO: 6 или любой из последовательностей 106-110.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело или его фрагмент включает не более чем одну, не более чем две или не более чем три из вышеуказанных замен. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или указанный фрагмент антитела включает VH CDR1 из SEQ ID NO: 1 или любой из SEQ ID NO: 61-67, VH CDR2 из SEQ ID NO: 2, VH CDR3 из SEQ ID NO: 3, VL CDR1 из SEQ ID NO: 4, VL CDR2 из SEQ ID NO: 5 и VL CDR3 из SEQ ID NO: 6.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или указанный фрагмент антитела включает VH CDR1 из SEQ ID NO: 1, VH CDR2 из SEQ ID NO: 2 или любой из SEQ ID NO: 68-77, VH CDR3 из SEQ ID NO: 3, VL CDR1 из SEQ ID NO: 4, VL CDR2 из SEQ ID NO: 5 и VL CDR3 из SEQ ID NO: 6.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или указанный фрагмент антитела включает VH CDR1 из SEQ ID NO: 1, VH CDR2 из SEQ ID NO: 2, VH CDR3 из SEQ ID NO: 3 или любой из SEQ ID NO: 78-90, VL CDR1 из SEQ ID NO: 4, VL CDR2 из SEQ ID NO: 5 и VL CDR3 из SEQ ID NO: 6.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или указанный фрагмент антитела включает VH CDR1 из SEQ ID NO: 1, VH CDR2 из SEQ ID NO: 2, VH CDR3 из SEQ ID NO: 3, VL CDR1 из SEQ ID NO: 4 или любой из SEQ ID NO: 91-92, VL CDR2 из SEQ ID NO: 5 и VL CDR3 из SEQ ID NO: 6.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или указанный фрагмент антитела включает VH CDR1 из SEQ ID NO: 1, VH CDR2 из SEQ ID NO: 2, VH CDR3 из SEQ ID NO: 3, VL CDR1 из SEQ ID NO: 4, VL CDR2 из SEQ ID NO: 5 или любой из SEQ ID NO: 93-105 и VL CDR3 из SEQ ID NO: 6.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или указанный фрагмент антитела включает VH CDR1 из SEQ ID NO: 1, VH CDR2 из SEQ ID NO: 2, VH CDR3 из SEQ ID NO: 3, VL CDR1 из SEQ ID NO: 4, VL CDR2 из SEQ ID NO: 5 и VL CDR3 из SEQ ID NO: 6, или любой из SEQ ID NO: 106-111.

Неограничивающие примеры VH представлены в SEQ ID NO: 7-26 и 113, при этом SEQ ID NO: 113

представляет собой VH мыши, а SEQ ID NO: 7-26 представляют собой гуманизированные последовательности. Кроме того, среди гуманизированных VH SEQ ID NO: 9-15, 17-21 и 23-26 включают одну или более обратных мутаций к варианту мыши. Сходным образом, неограничивающие примеры VL (VK) представлены в SEQ ID NO: 27-33. SEQ ID NO: 28 и 30 представляют собой исходные полученные гуманизированные последовательности с привитыми CDR, как показано в примерах. SEQ ID NO: 29 и 31-33 представляют собой гуманизированные VL с обратными мутациями.

Показано, что обратные мутации полезны для сохранения определенных характеристик антител против PD-L1. Соответственно согласно некоторым вариантам реализации антитела против PD-L1 согласно настоящему описанию, в частности, антитела человека или гуманизированные, включают одну или более обратных мутаций. Согласно некоторым вариантам реализации обратная мутация VH (т.е. включенная в определенном положении аминокислота) представляет собой одну или более мутаций, выбранных из (a) Ser в положении 44, (b) Ala в положении 49, (c) Ala в положении 53, (d) Ile в положении 91, (e) Glu в положении 1, (f) Val в положении 37, (g) Thr в положении 40, (h) Val в положении 53, (i) Glu в положении 54, (j) Asn в положении 77, (k) Arg в положении 94, и (l) Thr в положении 108, в соответствии с нумерацией по Kabat, и их комбинаций.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные обратные мутации выбирают из (a) Ser в положении 44, (b) Ala в положении 49, (c) Ala в положении 53, и/или (d) Ile в положении 91, в соответствии с нумерацией по Kabat, и их комбинаций.

Согласно некоторым вариантам реализации обратная мутация VL представляет собой одну или более мутаций, выбранных из (a) Ser в положении 22, (b) Gln в положении 42, (c) Ser в положении 43, (d) Asp в положении 60, и (e) Thr в положении 63, в соответствии с нумерацией по Kabat, и их комбинаций.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против PD-L1 согласно настоящему описанию включает VH из SEQ ID NO: 7-26, VL из SEQ ID NO: 27-33 или соответствующие им биологические эквиваленты. Биологический эквивалент VH или VL представляет собой последовательность, которая включает обозначенные аминокислоты, при этом идентичную в целом на 80, 85, 90, 95, 98 или 99%. Биологический эквивалент SEQ ID NO: 20, например, может представлять собой VH, последовательность которой в целом на 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 20, однако сохраняет области CDR (SEQ ID NO: 1-6 или их варианты) и, необязательно, сохраняет одну или более, или все из обратных мутаций. Согласно одному варианту реализации VH имеет последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 20, а VL имеет последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 28.

Дополнительно усовершенствованные антитела к PD-L1.

За счет применения случайного мутагенеза с контролируруемыми уровнями мутаций в примерах 13-17 удалось идентифицировать ряд горячих точек для мутаций остатков, в частности, в CDR3 из переменных областей как тяжелых (например, B6, C3, C6 и A1), так и легких цепей (например, A3) (см. табл. 14 и 15). Мутагенез проводили на шаблонном антителе, полученном из Hu1210-41 (как указано в сноске под табл. 14, шаблонное антитело WT содержит замену S60R (нумерация по Kabat) в CDR2 тяжелой цепи). Также Hu1210-41 включало замену G53A относительно химерного антитела (см. SEQ ID NO: 20) в VH CDR2. Антитело B6 из протестированных мутантных антител продемонстрировало значительно улучшенную аффинность связывания с PD-L1 человека и биологическую активность.

Согласно одному варианту реализации соответственно, предложены антитела и антигенсвязывающий фрагмент, которые включают следующие CDR (из мутанта S60R) и их варианты.

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH CDR1	SYDMS	1
VH CDR2	TISDAGGYIYRDSVKG	116
VH CDR3	EFGKRYALDY	3
VL CDR1	KASQDVTPAVA	4
VL CDR2	STSSRYT	5
VL CDR3	QQHYTTPLT	6

Согласно одному варианту реализации соответственно, предложены антитела и антигенсвязывающий фрагмент, которые включают следующие CDR (из B6) и их варианты.

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH CDR1	SYDMS	1
VH CDR2	TISDAGGYIYRDSVKG	116
VH CDR3	ELPWRALDY	117
VL CDR1	KASQDVTPAVA	4
VL CDR2	STSSRYT	5
VL CDR3	QQHYTTPLT	6

Согласно одному варианту реализации предложен(о) антитело или его фрагмент, отличающееся или отличающийся тем, что указанное антитело или указанный фрагмент антитела обладает специфичностью в отношении белка PD-L1 человека и содержит

(a) VH CDR1, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1 или варианте SEQ ID NO: 1, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 1;

(b) VH CDR2, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 116 или варианте SEQ ID NO: 116, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 116;

(c) VH CDR3, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 3 или варианте SEQ ID NO: 3, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 3, при этом второй остаток аминокислоты VH CDR3 представляет собой Leu;

(d) VL CDR1, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 4 или варианте SEQ ID NO: 4, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 4;

(e) VL CDR2, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5 или варианте SEQ ID NO: 5, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 5; и

(f) VL CDR3, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6 или варианте SEQ ID NO: 6, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 6.

Согласно одному варианту реализации предложен(о) антители или его фрагмент, отличающееся или отличающийся тем, что указанное антители или указанный фрагмент антитела обладает специфичностью в отношении белка PD-L1 человека и содержит

(a) VH CDR1, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1 или варианте SEQ ID NO: 1, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 1;

(b) VH CDR2, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 116 или варианте SEQ ID NO: 116, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 116;

(c) VH CDR3, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 117 или варианте SEQ ID NO: 117, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 117, при этом второй остаток аминокислоты VH CDR3 представляет собой Leu;

(d) VL CDR1, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 4 или варианте SEQ ID NO: 4, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 4;

(e) VL CDR2, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5 или варианте SEQ ID NO: 5, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 5; и

(f) VL CDR3, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6 или варианте SEQ ID NO: 6, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 6.

Примеры вариантов SEQ ID NO: 1 содержат одну замену аминокислоты в одном из положений остатков аминокислот 1, 2 и 5, например, SEQ ID NO: 61-67.

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH CDR1	<u>S</u> YDMS	1
	TYDMS	61
	<u>C</u> YDMS	62
	S <u>F</u> DMS	63
	S <u>H</u> DMS	64
	S <u>W</u> DMS	65
	SYD <u>M</u> T	66
	SYD <u>M</u> C	67

Примеры вариантов SEQ ID NO: 116 содержат одну или более замен аминокислот, например, SEQ ID NO: 118-127, 2 и 68-77. Согласно некоторым вариантам реализации указанные варианты представлены SEQ ID NO: 118-127.

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH CDR2	<u>T</u> ISDAGGYIYYRDSVKG	116
	TISDAGAYIYYRDSVKG	118
	TISDAGPYIYYRDSVKG	119
	TISDAGGEIYYRDSVKG	120
	TISDAGGHIYYRDSVKG	121
	TISDAGGW ^W IYYRDSVKG	122
	TISDAGGYIYYRDTVKG	123
	TISDAGGYIYYRDCVKG	124
	TISDAGGYIYYRDSLKG	125
	TISDAGGYIYYRDSIKG	126
	TISDAGGYIYYRDSMKG	127
	TISDGGGYIYYS ^S SVKG	2
	TISDGGAYIYYS ^S SVKG	68
	TISDGGPYIYYS ^S SVKG	69
	TISDGGGGIYYS ^S SVKG	70
	TISDGGGHIYYS ^S SVKG	71
	TISDGGGW ^W IYYS ^S SVKG	72
	TISDGGGYIYYS ^S DTVKG	73
	TISDGGGYIYYS ^S DCVKG	74
	TISDGGGYIYYS ^S DSLKG	75
	TISDGGGYIYYS ^S DSIKG	76
	TISDGGGYIYYS ^S DSMKG	77

Согласно некоторым вариантам реализации указанный третий остаток аминокислоты варианта VH CDR3 представляет собой Pro. Согласно некоторым вариантам реализации четвертый остаток аминокислоты варианта VH CDR3 представляет собой Trp.

Примеры вариантов SEQ ID NO: 3 содержат одну или более замен аминокислот в положениях остатков аминокислот 1-6, например, SEQ ID NO: 78-90.

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH CDR3	<u>E</u> FGKRYALDY	3
	QFGKRYALDY	78
	D ^D FGKRYALDY	79
	NFGKRYALDY	80
	EY ^Y GKRYALDY	81
	EHGKRYALDY	82
	EWGKRYALDY	83
	EFAKRYALDY	84
	EF ^P PKRYALDY	85
	EFGRRYALDY	86
	EFGK ^K RYALDY	87
	EFGKR ^F ALDY	88
	EFGKRHALDY	89
	EFGKR ^W ALDY	90

Примеры вариантов SEQ ID NO: 117 содержат одну или более замен аминокислот в положениях остатков аминокислот 1, 5 и 6, например, SEQ ID NO: 128-139.

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH CDR3	<u>E</u> LPWRYALDY (B6)	117
	ELFNRYALDY (B1)	128
	ELHFRYALDY (C3)	129
	ELYFRYALDY (C6)	130
	ELLHRYALDY (A1)	131
	ELRGRYALDY (A2)	132
	QLPWRYALDY	133
	DLPWRYALDY	134
	NLPWRYALDY	135
	ELPW ^K RYALDY	136
	ELPWR ^F ALDY	137
	ELPWRHALDY	138
	ELPWRWALDY	139

Согласно некоторым вариантам реализации указанный вариант SEQ ID NO: 4 содержит одну замену аминокислоты в положении остатка аминокислоты 3, например, SEQ ID NO: 91-92.

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VL CDR1	<u>K</u> A <u>S</u> QDVTPAVA	4
	KATQDVTPAVA	91
	KACQDVTPAVA	92

Согласно некоторым вариантам реализации указанный вариант SEQ ID NO: 5 содержит одну замену аминокислоты в одном из положений остатков аминокислот 1-6, например, SEQ ID NO: 93-105.

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VL CDR2	<u>STSSRYT</u>	5
	<u>T</u> TSSRYT	93
	<u>C</u> TSSRYT	94
	<u>S</u> SSRYT	95
	<u>S</u> MSSRYT	96
	<u>S</u> VSSRYT	97
	<u>S</u> TSSRYT	98
	<u>S</u> TCSRYT	99
	<u>S</u> TSTRYT	100
	<u>S</u> TSCRYT	101
	<u>S</u> TSSKYT	102
	<u>S</u> TSSRFT	103
	<u>S</u> TSSRHT	104
	<u>S</u> TSSRWT	105

Примеры вариантов SEQ ID NO: 6 содержат одну замену аминокислоты в одном из положений остатков аминокислот 1 и 2, например, SEQ ID NO: 106-111. Другой пример варианта представлен SEQ ID NO: 140.

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VL CDR3	<u>Q</u> QHYYTPLT	6
	<u>E</u> QHYYTPLT	106
	<u>D</u> QHYYTPLT	107
	<u>N</u> QHYYTPLT	108
	<u>Q</u> EHYYTPLT	109
	<u>Q</u> DHYYTPLT	110
	<u>Q</u> NHYYTPLT	111
	<u>Q</u> QHSDAPLT (A3)	140

Мутант A3, который содержит замены по трем положениям остатков в VL CDR3, также проявлял превосходную аффинность связывания с PD-L1 человека. Согласно одному варианту реализации, соответственно, предложены антитела и антигенсвязывающий фрагмент которые включают следующие CDR и их варианты.

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH CDR1	<u>S</u> YDMS	1
VH CDR2	TISDAGGYIYRDS <u>Y</u> KG	116
VH CDR3	<u>E</u> FGKRYALDY	3
VL CDR1	<u>K</u> A <u>S</u> QDVTPAVA	4
VL CDR2	<u>STSSRYT</u>	5
VL CDR3	<u>Q</u> QHSDAPLT	140

Согласно одному варианту реализации, соответственно, предложен(о) антитело или его фрагмент, отличающееся или отличающийся тем, что указанное антитело или указанный фрагмент антитела обладает специфичностью в отношении белка PD-L1 человека и содержит

(a) VH CDR1, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1 или варианте SEQ ID NO: 1, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 1;

(b) VH CDR2, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 116 или варианте SEQ ID NO: 116, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 116;

(c) VH CDR3, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 3 или варианте SEQ ID NO: 3, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 3;

(d) VL CDR1, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 4 или варианте SEQ ID NO: 4, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с

SEQ ID NO: 4;

(е) VL CDR2, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5 или варианте SEQ ID NO: 5, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 5; и

(f) VL CDR3, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 140 или варианте SEQ ID NO: 140, содержащем одну, две или три замены, делеции или инсерции по сравнению с SEQ ID NO: 140,

при этом по меньшей мере

(i) остаток аминокислоты 4 в VL CDR3 представляет собой Ser,

(ii) остаток аминокислоты 5 в VL CDR3 представляет собой Asp; или

(iii) остаток аминокислоты 6 в VL CDR3 представляет собой Ala.

Примеры вариантов SEQ ID NO: 1 содержат одну замену аминокислоты в одном из положений остатков аминокислот 1, 2 и 5, например, SEQ ID NO: 61-67.

Примеры вариантов SEQ ID NO: 116 содержат одну или более замен аминокислот, например, SEQ ID NO: 118-127, 2 и 68-77.

Примеры вариантов SEQ ID NO: 3 содержат одну или более замен аминокислот, например, SEQ ID NO: 117 и 128-139.

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH CDR3	<u>E</u> LPWRYALDY (B6)	117
	ELFNRYALDY (B1)	128
	ELHFRYALDY (C3)	129
	ELYFRYALDY (C6)	130
	ELLHRYALDY (A1)	131
	ELRGRYALDY (A2)	132
	<u>Q</u> LPWRYALDY	133
	<u>D</u> LPWRYALDY	134
	<u>N</u> LPWRYALDY	135
	ELPW <u>K</u> YALDY	136
	ELPWR <u>F</u> ALDY	137
	ELPWR <u>H</u> ALDY	138
	ELPWR <u>W</u> ALDY	139

Примеры вариантов SEQ ID NO: 4 содержат одну замену аминокислоты в положении остатка аминокислоты 3, например, SEQ ID NO: 91-92.

Примеры вариантов SEQ ID NO: 5 содержат одну замену аминокислоты в одном из положений остатков аминокислот 1-6, например, SEQ ID NO: 93-105.

Согласно некоторым вариантам реализации остаток аминокислоты 4 в варианте VL CDR3 представляет собой Ser. Согласно некоторым вариантам реализации остаток аминокислоты 5 в варианте VL CDR3 представляет собой Asp. Согласно некоторым вариантам реализации остаток аминокислоты 6 в варианте VL CDR3 представляет собой Ala. Примеры вариантов SEQ ID NO: 140 содержат одну замену аминокислоты в одном из положений остатков аминокислот 1 и 2, например, SEQ ID NO: 161-166.

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VL CDR3	<u>Q</u> QHSDAPLT	140
	<u>E</u> QHSDAPLT	161
	<u>D</u> QHSDAPLT	162
	<u>N</u> QHSDAPLT	163
	<u>Q</u> <u>E</u> HSDAPLT	164
	<u>Q</u> <u>D</u> HSDAPLT	165
	<u>Q</u> <u>N</u> HSDAPLT	166

Примеры антител, полученных в результате исследования мутагенеза, или их антигенсвязывающих фрагментов включают содержащие переменные области тяжелых цепей и легких цепей, представленные в табл. 15. Согласно одному варианту реализации переменная область тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 141, а переменная область легкой цепи включает SEQ ID NO: 142. Согласно одному варианту реализации переменная область тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 143, а переменная область легкой цепи включает SEQ ID NO: 144. Согласно одному варианту реализации переменная область тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 145, а переменная область легкой цепи включает SEQ ID NO: 146. Согласно одному варианту реализации переменная область тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 147, а переменная область легкой цепи включает SEQ ID NO: 148. Согласно одному варианту реализации переменная область тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 149, а переменная область легкой цепи включает SEQ ID NO: 150. Согласно одному варианту реализации переменная область тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 151, а переменная область легкой цепи включает SEQ ID NO: 152. Согласно одному

варианту реализации вариабельная область тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 153, а вариабельная область легкой цепи включает SEQ ID NO: 154. Согласно одному варианту реализации вариабельная область тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 155, а вариабельная область легкой цепи включает SEQ ID NO: 156. Согласно одному варианту реализации вариабельная область тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 157, а вариабельная область легкой цепи включает SEQ ID NO: 158. Согласно одному варианту реализации вариабельная область тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 159, а вариабельная область легкой цепи включает SEQ ID NO: 160.

Специалисту в данной области техники также будет понятно, что антитела согласно описанию в настоящем документе могут быть модифицированы таким образом, что их последовательность аминокислот отличается от последовательности встречающегося в природе связывающего полипептида, из которого они были получены. Например, полипептид или последовательность аминокислот, происходящий(ая) из определенного белка, может быть аналогичной, например, характеризоваться определенным процентом идентичности стартовой последовательности, например, может быть на 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична стартовой последовательности.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит последовательность аминокислот или один или более фрагментов, в норме не ассоциированных с антителом. Примеры модификаций более подробно описаны ниже. Например, антитело согласно настоящему описанию может содержать последовательность гибкого линкера, или может быть модифицирована путем добавления функционального фрагмента (например, ПЭГ, лекарственного средства, токсина или метки).

Антитела, варианты или их производные согласно настоящему описанию включают модифицированные производные, а именно, модифицированные путем ковалентного присоединения молекулы любого типа к антителу таким образом, чтобы ковалентная связь не предотвращала связывание указанного антитела с эпитопом. Например, но без ограничений, указанные антитела могут быть модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком и т.п. Любая из многочисленных химических модификаций может быть осуществлена с применением известных методик, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, специфического химического расщепления, ацетилирования, формилирования, метаболического синтеза туникамицина и т.п. Кроме того, антитела могут содержать одну или более неклассических аминокислот.

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

Указанные антитела могут быть конъюгированы или слиты с терапевтическим агентом, который может включать детектируемые метки, такие как радиоактивные метки, иммуномодулятор, гормон, фермент, олигонуклеотид, фотоактивный терапевтический или диагностический агент, цитотоксический агент, который может представлять собой лекарственное средство или токсин, агент для повышения качества ультразвукового исследования, нерадиоактивная метка, комбинацию перечисленного и другие такие агенты, известные в данной области техники.

Детектируемое мечение указанных антител может быть проведено путем сопряжения с хемилюминесцентным соединением. Затем определяют присутствие хемилюминесцентно-меченого антигенсвязывающего полипептида путем детекции люминесценции, возникающей в ходе химической реакции. Примерами конкретных подходящих для хемилюминесцентного мечения соединений являются люминол, изолуминол, ароматический сложный эфир акридина, имидазол, соль акридина и сложный эфир щавелевой кислоты.

Детектируемое мечение указанных антител также может быть проведено с применением флуоресцирующих металлов, таких как ^{152}Eu , или других металлов лантаноидного ряда. Указанные металлы могут быть присоединены к антителу с применением таких металлохелатирующих групп, как диэтилен-триаминпентауксусная кислота (ДТПК) или этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК). Методики конъюгации различных фрагментов с антителом хорошо известны; см., например, источники Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", в работе: Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), p. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", в работе: Controlled Drug Delivery (2nd ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., p. 623- 53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", в работе: Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), p. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", в работе: Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), Academic Press, p. 303-16 (1985); Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. (52:119-58(1982)).

Бифункциональные молекулы.

PD-L1 представляет собой молекулу - контрольную точку иммунного ответа, а также опухолевый антиген. Для получения биспецифического антитела специфическое в отношении PD-L1 антитело или

специфический в отношении PD-L1 антигенсвязывающий фрагмент может быть скомбинирован(о), в качестве нацеленной на опухолевый антиген молекулы, с вторым антигенсвязывающим фрагментом, специфическим в отношении иммунной клетки.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная иммунная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, В-клетки, моноцита, макрофага, нейтрофила, дендритной клетки, фагоцита, естественной клетки-киллера, эозинофила, базофила и тучной клетки. Подходящие для нацеливания молекулы на иммунной клетке включают, например, CD3, CD16, CD19, CD28 и CD64. Другие примеры включают PD-1, CTLA-4, LAG-3 (также известный как CD223), CD28, CD122, 4-1BB (также известный как CD137), TIM3, OX-40 или OX40L, CD40 или CD40L, LIGHT, ICOS/ICOSL, GITR/GITRL, TIGIT, CD27, VISTA, B7H3, B7H4, HEVМ или BTLA (также известный как CD272), иммуноглобулиноподобные рецепторы клеток-киллеров (KIR) и CD47. Конкретные примеры биспецифичности включают без ограничения PD-L1/PD-1, PD-L1/LAG3, PD-L1/TIGIT и PD-L1/CD47.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфическое(ий) в отношении PD-L1, может быть скомбинирован(о), в качестве ингибитора иммунных контрольных точек, с вторым антигенсвязывающим фрагментом, специфическим в отношении опухолевого антигена, для получения биспецифического антитела. "Опухолевый антиген" представляет собой антигенное вещество, продуцируемое в опухолевых клетках, т.е. он запускает иммунный ответ у хозяина. Опухолевые антигены подходят для идентификации опухолевых клеток и являются потенциальными кандидатами для применения в терапии рака. Нормальные белки в организме не являются антигенными. Определенные белки, однако, продуцируются или избыточно экспрессируются при туморогенезе и, соответственно, кажутся организму "чужеродными".

Указанные белки могут включать хорошо секвестрированные недоступные для иммунной системы нормальные белки, белки, в норме продуцируемые в экстремально малых количествах, белки, в норме продуцируемые только на определенных стадиях развития, или белки, структура которых модифицирована из-за мутации.

В данной области техники известно множество опухолевых антигенов и новые опухолевые антигены могут быть легко идентифицированы с помощью скрининга. Неограничивающие примеры опухолевых антигенов включают рЭФР, Her2, EpCAM, CD20, CD30, CD33, CD47, CD52, CD133, CD73, КЭА, grA33, муцины, TAG-72, CIX, PCMA, фолат-связывающий белок, GD2, GD3, GM2, ФРЭС, VEGFR (рецептор ФРЭС), интегрин, $\alpha V\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, ERBB2, ERBB3, MET, IGF1R, EPHA3, TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP и тенацин.

Согласно некоторым аспектам моновалентная единица обладает специфичностью в отношении белка, который избыточно экспрессируется на опухолевой клетке по сравнению с соответствующей неопухолевой клеткой. "Соответствующая неопухолевая клетка" в настоящем документе относится к неопухолевой клетке, принадлежащей к тому же типу клеток, что и исходный тип для опухолевой клетки. Отметим, что такие белки не обязательно отличаются от опухолевых антигенов. Неограничивающие примеры включают карциноэмбриональный антиген (КЭА), который избыточно экспрессируется в большинстве карцином ободочной кишки, прямой кишки, молочной железы, легкого, поджелудочной железы и желудочно-кишечного тракта; рецепторы херегулинов (HER-2, neu или c-erbB-2), часто избыточно экспрессируемые при раке молочной железы, яичника, ободочной кишки, легкого, предстательной железы и шейки матки; рецептор эпидермального фактора роста (рЭФР), на высоком уровне экспрессируемый в ряде солидных опухолей, включая опухоли молочной железы, головы и шеи, мелкоклеточный рак легкого и предстательной железы; асиалогликопротеиновый рецептор; рецептор трансферрина; рецептор серпин-ферментного комплекса, экспрессируемый на гепатоцитах; фактор роста фибробластов рецептор (FGFR), избыточно экспрессируемый на клетках аденокарциномы протоков поджелудочной железы; рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) для антиангиогенной генной терапии; рецептор фолиевой кислоты, избирательно избыточно экспрессируемый в 90% немучинозных карцином яичников; гликокаликс поверхности клеток; рецепторы углеводов; и рецептор полимерных иммуноглобулинов, подходящий для доставки генов в клетки эпителия дыхательных путей и привлекательный для лечения заболеваний легких, таких как кистозный фиброз. Неограничивающие примеры биспецифичности в указанном случае включают PD-L1/рЭФР, PD-L1/Her2, PD-L1/CD33, PD-L1/CD133, PD-L1/КЭА и PD-L1/ФРЭС.

Также предложены биспецифические антитела другого формата. Согласно некоторым вариантам реализации оба фрагмента, направленный против PD-L1 фрагмент и второй фрагмент, независимо выбраны из Fab-фрагмента, одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) или однодоменного антитела. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело дополнительно включает Fc-фрагмент.

Также предложены бифункциональные молекулы, которые включают не только антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфический в отношении PD-L1, такое(ой) как описанные в настоящем документе, может быть скомбинирован(о) в качестве нацеленной на опухолевый антиген молекулы с иммунным цитокином или лигандом, необязательно посредством пептидного линкера. Связанные иммунные цитокины или лиганды включают, не ограничиваясь

перечисленными, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, ГМ-КСФ, ФНО- α , CD40L, OX40L, CD27L, CD30L, 4-1BBL, LIGHT и GITRL. Такие бифункциональные молекулы могут обеспечивать комбинацию блокирующей контрольную точку иммунного ответа эффекта и локальную иммуномодуляцию в сайте опухоли.

Полинуклеотиды, кодирующие антитела, и способы получения антител.

Согласно настоящему изобретению также предложены выделенные полинуклеотиды или молекулы нуклеиновых кислот (например, SEQ ID NO: 34-60, 112 и 114), кодирующие антитела, их варианты или производные согласно настоящему описанию. Полинуклеотиды согласно настоящему описанию могут кодировать полные переменные области тяжелых и легких цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов. Кроме того, полинуклеотиды согласно настоящему описанию могут кодировать части переменных областей тяжелых и легких цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов.

Способы получения антител хорошо известны в данной области техники и описаны в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации как переменные, так и константные области антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему описанию являются полностью человеческими. Полностью человеческие антитела могут быть получены с применением методик, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе. Например, полностью человеческие антитела против конкретного антигена могут быть получены путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для получения таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, причем эндогенные локусы у него были дезактивированы. Примеры методик, которые могут применяться для получения таких антител, описаны в патентах США 6150584; 6458592; 6420140, которые включены в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации полученные антитела не вызывают пагубного иммунного ответа у животного, подлежащего лечению, например, у человека. Согласно одному варианту реализации антигенсвязывающие полипептиды, их варианты или производные согласно настоящему описанию модифицированы для снижения иммуногенности с применением известных в данной области техники методик. Например, антитела могут быть гуманизированы, приматизированы, деиммунизированы; или могут быть получены химерные антитела. Указанные типы антител происходят из антитела, полученного не от человека, как правило, из антитела мыши или примата, которое сохраняет или по существу сохраняет антигенсвязывающие свойства исходного антитела, однако менее иммуногенные у человека. Это может быть достигнуто разными способами, в том числе путем

(a) прививки полных полученных не от человека переменных доменов на константные области человека с получением химерных антител;

(b) прививки по меньшей мере части одной или более полученных не от человека определяющих комплементарность областей (CDR) на каркасные и константные области человека с сохранением или без сохранения критически важных остатков каркасных областей; или путем

(c) трансплантации полных полученных не от человека переменных доменов, но с "маскировкой" их участком, подобным участку человека, путем замены поверхностных остатков. Такие способы раскрыты в источниках: Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 57:6851-6855 (1984); Morrison et al., Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun., 25:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31:169-217 (1994); и в патентах США № 5585089, 5693761, 5693762 и 6190370, все из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылок.

Для снижения иммуногенности антитела может также применяться деиммунизация. В настоящем документе термин "деиммунизация" включает изменение антитела с модификацией Т-клеточных эпитопов (см., например, опубликованные международные заявки WO/9852976 A1 и WO/0034317 A2). Например, анализируют переменные последовательности тяжелых цепей и переменные последовательности легких цепей исходного антитела, и создают "карту" Т-клеточных эпитопов человека из каждой V-области, отражающую локализацию эпитопов относительно определяющих комплементарность областей (CDR) и других ключевых остатков в последовательности. Индивидуальные Т-клеточные эпитопы с карты Т-клеточных эпитопов анализируют для идентификации альтернативных замен аминокислот с низким риском изменения активности итогового антитела. Разрабатывают ряд последовательностей альтернативных переменных областей тяжелых и легких цепей, содержащих комбинации замен аминокислот, и указанные последовательности затем включают в ряд связывающих полипептидов. Как правило, получают и тестируют связывание и/или функции 12-24 вариантов антител. После этого полные гены тяжелых и легких цепей, содержащие модифицированные переменные и константные области человека, клонируют в экспрессионные векторы, и полученные плазмиды вводят в линии клеток с получением полноразмерного антитела. Затем указанные антитела сравнивают, проводя подходящие биохимические и биологические анализы, и идентифицируют оптимальный вариант.

Специфичность связывания антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему описанию может быть определена с применением анализов *in vitro*, таких как иммунопреципитация, радиоиммунологический анализ (РИА) или ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA).

Как вариант, описанные методики получения одноцепочечных единиц (патент США № 4694778; Bird, Science, 242:423-442 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 55:5879-5883 (1988); и Ward et al., Nature, 334:544-554 (1989)) могут быть адаптированы для получения одноцепочечных единиц согласно настоящему описанию. Одноцепочечные единицы образуются путем соединения фрагментов тяжелых и легких цепей Fv-области через аминокислотный мостик, с получением одноцепочечного слитого пептида. Могут также применяться методики сборки функциональных Fv-фрагментов в *E.coli* (Skerra et al., Science, 242:1038-1041 (1988)).

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

Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антител, происходящие из антитела, полученного от вида, не являющегося человеком, которые связывают требуемый антиген, содержащие одну или более определяющих комплементарность областей (CDR) от вида, не являющегося человеком, и каркасные области из молекулы иммуноглобулина человека. Часто каркасные остатки в каркасных областях человека заменяют на соответствующий остаток CDR донорного антитела для изменения, предпочтительно улучшения, связывания антигена. Указанные замены в каркасных областях идентифицируют с применением способов, хорошо известных в данной области техники, например, моделируя взаимодействия CDR и каркасных остатков для идентификации каркасных остатков, важных для связывания антигена, и сравнивая последовательности для идентификации необычных каркасных остатков в конкретных положениях. (См., например, источники Queen et al., патент США № 5585089; Riechmann et al., Nature, 332:323 (1988), которые включены в настоящий документ полностью посредством ссылок). Антитела могут быть гуманизированы с применением различных методик, известных в данной области техники, включая, например, прививку CDR (EP 239400; PCT-публикация WO 91/09967; патенты США № 5225539; № 5530101; и № 5585089), маскировку или модификацию поверхности (EP 592106; EP 519,596; Padlan, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., Proc. Natl. Sci., USA, 91:969-973 (1994)), и перестановку цепей (патент США № 5565332, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки).

Применение полностью человеческих антител, в частности, желательно для терапевтического лечения пациентов-людей. Антитела человека могут быть получены различными способами, известными в данной области техники, в том числе способами фогового дисплея с применением библиотек антител, происходящих из последовательностей иммуноглобулинов человека. См. также патенты США № 4444887 и 4716111; и PCT-публикации WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741; каждый из указанных источников включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Антитела человека могут также быть получены с применением трансгенных мышей, неспособных экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, однако способные экспрессировать гены иммуноглобулинов человека. Например, комплексы генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов человека могут быть введены случайным образом или путем гомологичной рекомбинации в эмбриональные стволовые клетки мыши. Как вариант, вариабельная область, константная область и область разнообразия человека могут быть введены в эмбриональные стволовые клетки мыши наряду с генами человека тяжелых и легких цепей. Гены тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов мыши могут быть лишены функциональности, отдельно или одновременно с введением локусов иммуноглобулина человека путем гомологичной рекомбинации. В частности, гомозиготная делеция JH-области предотвращает продуцирование эндогенных антител. Модифицированные эмбриональные стволовые клетки размножают и вводят путем микроинъекции в бластоцисты для получения химерных мышей. Затем указанных химерных мышей скрещивают для получения гомозиготного потомства, которое экспрессирует антитела человека. Указанных трансгенных мышей иммунизируют обычным способом выбранным антигеном, например, полным требуемым целевым полипептидом или его частью. Моноклональные антитела, направленные против антигена, могут быть получены от иммунизированных трансгенных мышей с применением стандартной гибридомной технологии. Трансгены иммуноглобулинов человека, носители которых являются трансгенные мыши, подвергают реаранжировке во время дифференцировки В-клеток, а затем проходят через переключение классов и соматический мутагенез. Соответственно применение такой методики позволяет получить терапевтически полезные антитела IgG, IgA, IgM и IgE. Об-

щую информацию относительно указанной технологии получения антител человека можно найти в источнике Lonberg and Huszar, *Int. Rev. Immunol.*, 73:65-93 (1995). Подробное описание указанной технологии получения антител человека и моноклональных антител человека, а также протоколы для получения таких антител можно найти, например, в РСТ-публикациях WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; патентах США № 5413923; № 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806; 5814318; и 5939598, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылок. Кроме того, такие компании как Abgenix, Inc. (Фремонт, Калифорния) и GenPharm (Сан-Хосе, Калифорния) могут быть привлечены для получения антител человека, направленных против выбранного антигена, с применением технологии, аналогичной описанной выше.

Полностью человеческие антитела, которые распознают выбранный эпитоп, могут также быть получены с применением методики, называемой "направляемым отбором". Согласно указанному подходу выбранное полученное не от человека моноклональное антитело, например, антитело мыши, применяют для того, чтобы направлять отбор полностью человеческого антитела, распознающего тот же эпитоп. (Jespers et al., *Bio/Technology*, 72:899-903 (1988). См. также патент США № 5565332, который включен полностью посредством ссылки).

Согласно другому варианту реализации ДНК, кодирующая требуемые моноклональные антитела, может быть легко выделена и секвенирована с применением стандартных процедур (например, путем применения олигонуклеотидных зондов, которые способны к специфическому связыванию с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител мыши). Выделенные и субклонированные гибридные клетки служат в качестве предпочтительного источника такой ДНК. После выделения ДНК может быть помещена в экспрессионные векторы, которыми затем трансфицируют прокариотические или эукариотические клетки-хозяева, такие как клетки *E.coli*, клетки обезьяны COS, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки миеломы, которые в иных случаях не продуцируют иммуноглобулины. Конкретнее, выделенная ДНК (которая может быть синтетической согласно настоящему описанию) может быть использована для клонирования последовательностей константных и переменных областей для получения антител согласно описанию в патенте США № 5658570 (Newman с соавторами), поданном 25 января 1995 г., который в настоящий документ включен посредством ссылки. По существу, это подразумевает экстракцию РНК из выбранных клеток, преобразование в кДНК и амплификацию с помощью ПЦР с применением Ig-специфических праймеров. Подходящие для указанной цели праймеры также описаны в патенте США № 5658570. Как более подробно обсуждается ниже, трансформированные клетки, экспрессирующие требуемое антитело, могут быть выращены в относительно больших количествах для обеспечения клинических и коммерческих поставок иммуноглобулина.

Кроме того, одна или более областей CDR антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему описанию могут быть инсертированы, с применением обычных методик рекомбинантной ДНК, в каркасные области, например, в каркасные области человека для гуманизации полученного не от человека антитела. Каркасные области могут быть представлены встречающимися в природе или консенсусными каркасными областями, предпочтительно -каркасными областями человека (см., например, перечень каркасных областей человека в источнике Chothia et al., *J. Mol Biol.*, 278:457-479 (1998)). Предпочтительно полинуклеотид, полученный путем комбинирования каркасных областей и CDR, кодирует антитело, которое специфически связывается по меньшей мере с одним эпитопом требуемого полипептида, например, LIGHT. Предпочтительно в каркасные области могут быть введены одна или более замен аминокислот, и предпочтительно указанные замены аминокислот улучшают связывание указанного антитела с его антигеном. Кроме того, такие способы могут применяться для получения замен аминокислот или делеций одного или более остатков цистеина переменной области, участвующих в образовании внутрицепочечной дисульфидной связи, с получением молекул антитела, лишенных одной или более внутрицепочечных дисульфидных связей. Другие изменения полинуклеотида также предусмотрены настоящим изобретением и известны в данной области техники.

Кроме того, могут применяться методики, разработанные для получения "химерных антител" (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 851-855 (1984); Neuberger et al., *Nature*, 372:604-608 (1984); Takeda et al., *Nature*, 314:452-454 (1985)) путем сплайсинга генов из молекулы антитела мыши с подходящей антигенной специфичностью совместно с генами из молекулы антитела человека с подходящей биологической активностью. В настоящем документе химерное антитело представляет собой молекулу, разные части которой происходят из разных видов животных, например, молекулы, содержащие переменную область, происходящую из моноклонального антитела мыши, и константную область иммуноглобулина человека.

Еще один высокоэффективный способ получения рекомбинантных антител описан в источнике Newman, *Biotechnology*, 10:1455-1460 (1992). В частности, указанная методика обеспечивает получение приматизированных антител, которые содержат переменные домены обезьяны и константные последовательности человека. Указанный источник полностью включен посредством ссылки в настоящий документ. Кроме того, указанная методика также описана в принадлежащих одному правообладателю патентах США № 5658570, 5693780 и 5756096 каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки.

Как вариант, продуцирующие антитело линии клеток могут быть выбраны и культивированы с применением методик, хорошо известных специалисту. Такие методики описаны в различных лабораторных руководствах и основных публикациях. При этом методики, подходящие для описанного ниже применения согласно настоящему изобретению, приведены в источнике Current Protocols in Immunology, Coligan et al., eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York (1991), который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки, включая приложения.

Кроме того, для введения мутаций в последовательность нуклеотидов, кодирующую антитело согласно настоящему описанию, которые приводят к заменам аминокислот, могут применяться стандартные методики, известные специалистам в данной области техники, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, сайт-специфический мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Предпочтительно варианты (в том числе производные) кодируют менее чем 50 замен аминокислот, менее чем 40 замен аминокислот, менее чем 30 замен аминокислот, менее чем 25 замен аминокислот, менее чем 20 замен аминокислот, менее чем 15 замен аминокислот, менее чем 10 замен аминокислот, менее чем 5 замен аминокислот, менее чем 4 замены аминокислот, менее чем 3 замены аминокислот или менее чем 2 замены аминокислот относительно референсной вариабельной области тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, вариабельной области легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 или CDR-L3. Как вариант, мутации могут быть введены случайным образом на протяжении всей кодирующей последовательности или ее части, например, с помощью насыщающего мутагенеза, и может быть проведен скрининг итоговых мутантов на биологическую активность для идентификации мутантов, сохраняющих активность.

Лечение рака.

Согласно описанию в настоящем документе антитела, их варианты или производные согласно настоящему изобретению могут применяться в определенных способах лечения и диагностики.

Настоящее изобретение относится также к терапии на основе антител, включающей введение антител согласно настоящему описанию пациенту, например, животному, млекопитающему и человеку, для лечения одного или более из расстройств или состояний, описанных в настоящем документе. Терапевтические соединения согласно настоящему описанию включают, не ограничиваясь перечисленными, антитела согласно настоящему описанию (в том числе их варианты и производные согласно описанию в настоящем документе), а также нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды, кодирующие антитела согласно настоящему описанию (в том числе их варианты и производные согласно описанию в настоящем документе).

Антитела согласно настоящему описанию могут также применяться для лечения или ингибирования рака. PD-L1 может избыточно экспрессироваться в опухолевых клетках. Происходящий из опухоли PD-L1 может связываться с PD-1 на иммунных клетках, ограничивая таким образом противоопухолевый Т-клеточный иммунитет. Результаты применения низкомолекулярных ингибиторов или моноклональных антител, нацеленных на PD-L1, в моделях опухолей на мышах показывают, что нацеленная на PD-L1 терапия является важной альтернативой и представляет собой реалистичный подход к эффективному контролю роста опухоли. Как продемонстрировано в экспериментальных примерах, антитела против PD-L1 активировали механизмы адаптивного иммунного ответа, что может приводить к улучшенному выживанию у страдающих раком пациентов.

Соответственно согласно некоторым вариантам реализации предложены способы лечения рака у нуждающегося в этом пациента. Указанный способ, согласно одному варианту реализации, подразумевает введение указанному пациенту эффективного количества антитела согласно настоящему описанию. Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере одна из раковых клеток (например, стромальных клеток) у пациента экспрессирует, избыточно экспрессирует или индуцирована, чтобы экспрессировать PD-L1. Индукция экспрессии PD-L1, например, может быть проведена путем введения противоопухолевой вакцины или проведения радиационной терапии.

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

Также согласно настоящему изобретению предложена клеточная терапия, например, терапия с применением Т-клеточных химерных антигенных рецепторов (CAR). Может применяться подходящая клетка, которую приводят в контакт с антителом против PD-L1 согласно настоящему описанию (или, как вариант, сконструированная таким образом, чтобы экспрессировать антитело против PD-L1 согласно настоящему описанию). После такого контакта или конструирования клетка может быть, соответственно, введена страдающему раком пациенту, нуждающемуся в лечении. У указанного страдающего раком пациента может наблюдаться рак любого типа из описанных в настоящем документе. Клетка (например, Т-клетка) может представлять собой, например, инфильтрирующий опухоль Т-лимфоцит, CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку или комбинацию перечисленных клеток, без ограничения.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка была выделена собственно из орга-

низма страдающего раком пациента. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка была получена от донора или из банка клеток. Если клетку выделяют из организма страдающего раком пациента, нежелательные иммунные реакции могут быть минимизированы.

Дополнительные заболевания или состояния, ассоциированные с повышенной выживаемостью клеток, лечение, предотвращение, диагностика и/или прогнозирование которых может быть проведено с применением антител или их вариантов или производных согласно настоящему описанию, включают, не ограничиваясь перечисленными, прогрессирование и/или метастазирование злокачественных новообразований и связанных с ними расстройств, таких как лейкоз (в том числе острые лейкозы (например, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз (в том числе миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный лейкоз и эритролейкоз)) и хронические лейкозы (например, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз)), истинная полицитемия, лимфомы (например, болезнь Ходжкина и неходжкинская лимфома), множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей и солидные опухоли, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, саркомы и карциномы, такие как фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, карцинома толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак щитовидной железы, рак эндометрия, меланома, рак предстательной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточная карцинома, базально-клеточная карцинома, аденокарцинома, карцинома потовых желез, карцинома сальных желез, папиллярная карцинома, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарциномы, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечноклеточный рак, гепатома, карцинома желчного протока, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, карцинома легкого, мелкоклеточная карцинома легкого, карцинома мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитома, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимомы, пинеалома, гемангиобластома, акустическая невринома, олигодендроглиома, менингиома, меланома, нейробластома и ретинобластома.

Варианты комбинированной терапии.

Согласно дополнительному варианту реализации композиции согласно настоящему описанию вводят в комбинации с антинеопластическим агентом, противовирусным агентом, антибактериальным или антибиотическим агентом или антимикотическими агентами. Любой из указанных агентов, известных в данной области техники, может быть введен в композиции согласно настоящему изобретению.

Согласно другому варианту реализации композиции согласно настоящему описанию вводят в комбинации с химиотерапевтическим агентом. Химиотерапевтические агенты, которые могут быть введены с композициями согласно настоящему описанию, включают, не ограничиваясь перечисленным, производные антибиотиков (например, доксорубицин, блеомицин, даунорубицин и дактиномицин); антиэстрогены (например, тамоксифен); антиметаболиты (например, фторурацил, 5-FU, метотрексат, флоксурин, интерферон альфа-2b, глутаминовую кислоту, пликамицин, меркаптопурин и 6-тиогуанин); цитотоксические агенты (например, кармустин, BCNU, ломустин, CCNU, цитозинарабинозид, циклофосфамид, эстрамустин, гидроксимочевину, прокарбазин, митомицин, бусульфан, цисплатин и сульфат винкристина); гормоны (например, медроксипрогестерон, эстрамустина натрия фосфат, этинилэстрадиол, эстрадиол, мегестрола ацетат, метилтестостерон, диэтилstilбестрол дифосфат, хлортрианизен и тестостерон); производные мустаргена (например, мефален, хлорамбуцил, мехлорэтамин (мустарген) и тиотепа); стероиды и их комбинации (например, бетаметазона натрия фосфат); и другие (например, дикарбазин, аспарагиназа, митотан, сульфат винкристина, сульфат винбластин и этопозид).

Согласно дополнительному варианту реализации композиции согласно настоящему описанию вводят в комбинации с цитокинами. Цитокины, которые могут быть введены с композициями согласно настоящему описанию, включают, не ограничиваясь перечисленными, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, анти-CD40, CD40L и ФНО-α.

Согласно дополнительным вариантам реализации композиции согласно настоящему описанию вводят в комбинации с другими терапевтическими или профилактическими режимами, такими как, например, лучевая терапия.

Также предложены варианты комбинированной терапии, которая включает применение одного или более из антител против PD-L1 согласно настоящему описанию наряду с вторым противораковым (химиотерапевтическим) агентом. Химиотерапевтические агенты могут быть распределены в соответствии с их механизмом действия, например, в следующие группы:

антиметаболиты/противораковые агенты, такие как аналоги пиримидинов флоксурин, капецитабин и цитарабин;

аналоги пуринов, антагонисты фолатов и родственные им ингибиторы;

антипролиферативные/антимитотические агенты, в том числе природные продукты, такие как алкалоид барвинка (винбластин, винкристин), и действующие на микротрубочки агенты, такие как таксан (паклитаксел, доцетаксел), винбластин, нокадазол, эпотилоны, винорелбин (НАВЕЛЬБИН®), и эпиопо-

дофиллотоксины (этопозид, тенипозид);

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

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

ферменты, такие как L-аспарагиназа, которая системно метаболизирует L-аспарагин и лишает его клетки, которые не обладают способностью синтезировать собственный аспарагин;

антитромбоцитарные агенты;

антипролиферативные/антимитотические алкилирующие агенты, такие как мустаргены циклофосфамид и аналоги (мелфалан, хлорамбуцил, гексаметилмеламин и тиотепа), алкилнитрозомочевины (кармустин) и аналоги, стрептозоцин и триазены (дакарбазин);

антипролиферативные/антимитотические антиметаболиты, такие как аналоги фолиевой кислоты (метотрексат);

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

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

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

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

препятствующие миграции агенты;

антисекреторные агенты (брефельдин);

иммуносупрессивные вещества такролимус, сиролимус, азатиоприн и микофенолат;

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

блокаторы ангиотензиновых рецепторов, доноры оксида азота;

антисмысловые олигонуклеотиды;

антитела, такие как трастузумаб и ритуксимаб;

ингибиторы клеточного цикла и индукторы дифференцировки, такие как третиноин;

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

ингибиторы киназ передачи сигналов факторов роста;

индукторы дисфункции;

токсины, такие как холерный токсин, ризин, Pseudomonas экзотоксин, аденилатциклазный токсин Bordetella pertussis, дифтерийный токсин и активаторы каспазы; и хроматин.

Дополнительные примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN®);

алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан;

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

этиленамины и метиленамины, в том числе алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамида, триэтилентифосфорамида и триметиолмеламин;

ацетогенины, в частности, буллатацин и буллатацинон;

камптотецин, в том числе синтетический аналог топотекан;

бриостатин;

каллистатин;

СС-1065, в том числе его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелесин;

криптофицины, в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8;

доластатин;

дуокармицин, в том числе синтетические аналоги KW-2189 и CBI-TMI;

элеутеробин;

панкратистатин;

саркодиктин;

спонгистатин;

мустаргены, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, циклофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтаминоксида гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид и урамустин;

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

антибиотики, такие как эндиновые антибиотики (например, калихеамицин, в частности, калихеамицин гамма-II и калихеамицин phiII), динемидин, включая динемидин А, бисфосфонаты, такие как клодронат, эспермицин, неокарциностаин с хромофором и родственные эндиновые антибиотик-хромопротеины с хромофорами, аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, сактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (в том числе морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин, и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорибицин, идарубицин, марселломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностаин и зорубицин;

антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU);

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

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

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

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

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

восполнители фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота;

трихотецины, в частности, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангидин;

таксоиды, такие как паклитаксел (TAXOL®) и доцетаксел (TAKCOTER®);

аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин;

ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминоклевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрин; эдотрексат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; эфлорнитин; эллиптиния ацетат; эпотион; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лейковорин; лонидамин; мейтансиноиды, такие как майтансин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитрактин; пентостаин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; фторпиримидин; фолиновую кислоту; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахарид-К (PSK); разоксан; ризоксин; сизофран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндизин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ага-С"); циклофосфамид; тиотепа; хлорамбуцил;

гемцитабин (GEMZAR®); 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; винбластин; платину; этопози (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин (навельбин, NAVELBINE®); новантрон; тенипозид; эдотрексат; дауномицин; аминоклутетин; кселода; ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DFMO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; FOLFIRI (фторурацил, лейковорин и иринотекан); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные чего-либо из вышеперечисленного.

Также определением "химиотерапевтического агента" охвачены антигормональные агенты, такие как антиэстрогены и селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов (SERM), ингибиторы фермента ароматазы, антиандрогены, а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные чего-либо из вышеперечисленного, которые регулируют или ингибируют действие гормонов на опухоли.

Примеры антиэстрогенов и SERM включают, например, тамоксифен (в том числе нольвадекс, NOLVADEX™), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (фарестон, FARESTON®).

Ингибиторы фермента ароматазы регулируют продуцирование эстрогена надпочечными железами. Примеры включают 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, мегестрол ацетат (мегейс, MEGACE®), эксестан, форместан, фадрозол, ворозол (ривизор, RIVISOR®), летрозол (фемара, FEMARA®) и анастрозол (аримидекс, ARIMIDEX®).

Примеры антиандрогенов включают флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин.

Примеры химиотерапевтических агентов также включают антиангиогенные агенты, в том числе, однако не ограничиваясь перечисленными, ретиноевую кислоту и ее производные, 2-метоксиэстрадиол, ангиостатин (ANGIOSTATIN®), эндостатин (ENDOSTATIN®), сурамин, скваламин, тканевый ингибитор металлопротеиназы-1, тканевый ингибитор металлопротеиназы-2, ингибитор активатора плазминогена-1, ингибитор активатора плазминогена-2, хрящевой ингибитор, паклитаксел (наб-паклитаксел), тромбозитарный фактор 4, сульфат протамина (клупейн), сульфатированные производные хитина (полученные из панцирей краба-стригуна), комплекс сульфатированных полисахаридов с пептидогликанами (sp-pg), стауроспорин, модуляторы матричного метаболизма, в том числе аналоги пролина ((1-ацетидин-2-карбоновая кислота (LACA)), цисгидроксипролин, d,l-3,4-дегидропролин, тиетролин, α,α'-дипиридил, бета-аминопропионитрилфумарат, 4-пропил-5-(4-пиридинил)-2(3h)-оксазолон, метотрексат, митоксантрон, гепарин, интерфероны, сывороточный 2-макроглобулин, ингибитор металлопротеиназы-3 курицы (ChIMP-3), хмостатин, бета-циклодекстринтетрадекасульфат, эпонемицин, фуагиллин, ауротиомалат

натрия, d-пеницилламин, сывороточную бета-1-антиколлагеназу, альфа-2-антиплазмин, бизантрен, лобензарит динатрия, динатриевую соль n-2-карбоксифенил-4-хлорантраниловой кислоты, или "ССА", талидомид, ангиостатический стероид, карбоксиаминоимидазол и ингибиторы металлопротеиназы, такие как ВВ-94. Другие антиангиогенные агенты включают антитела, предпочтительно моноклональные антитела против указанных ангиогенных факторов роста: бета-ФРФ, альфа-ФРФ, ФРФ-5, изоформ ФРЭС, ФРЭС-С, ФРГ/SF и Ang-1/Ang-2.

Примеры химиотерапевтических агентов также включают антифибротические агенты, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, такие соединения, как бета-аминопропионитрил (BAPN), а также соединения, раскрытые в патенте США № 4965288 (Palfreyman, et al.), относящемся к ингибиторам лизилоксидазы и их применению в лечении заболеваний и состояний, ассоциированных с аномальным отложением коллагена, и в патенте США № 4997854 (Kagan et al.), относящемся к ингибирующим LOX соединениям для лечения различных патологических фиброзных состояний, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Дополнительные примеры ингибиторов описаны в патенте США № 4943593 (Palfreyman et al.), относящемся к соединениям, таким как 2-изобутил-3-фтор-, хлор- или бром-аллиламин, патентах США № 5021456 (Palfreyman et al.), № 5059714 (Palfreyman et al.), № 5120764 (McCarthy et al.), № 5182297 (Palfreyman et al.), № 5252608 (Palfreyman et al.), относящихся к 2-(1-нафтилрксиметил)-3-фтораллиламинам; и публикации США № 2004/0248871 (Farjanel et al.), которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Примеры антифибротических агентов также включают первичные амины, вступающие в реакции с карбонильной группой активного сайта лизилоксидаз, и, конкретнее, те, которые продуцируют, после связывания с карбонилем, продукт, стабилизируемый резонансом, такие как следующие первичные амины: этилендиамин, гидразин, фенилгидразин и их производные; семикарбазид и производные мочевины; аминонитрилы, такие как BAPN или 2-нитроэтиламин; ненасыщенные или насыщенные галоамины, такие как 2-бром-этиламин, 2-хлорэтиламин, 2-трифторэтиламин, 3-бромпропиламин и п-галобензиламины; и селеномоцистеинлактон.

Другие антифибротические агенты представлены медь-хелатирующими агентами, проникающими или не проникающими в клетки. Примеры соединений включают не прямые ингибиторы, которые блокируют производные альдегидов, получаемые путем окислительного дезаминирования остатков лизила и гидроксизила лизилоксидазами. Примеры включают тиоламины, в частности, D-пеницилламин и его аналоги, такие как 2-амино-5-меркапто-5-метилгексановая кислота, D-2-амино-3-метил-3-((2-ацетамидоэтил)дитио)бутановая кислота, p-2-амино-3-метил-3-((2-аминоэтил)дитио)бутановая кислота, натрий-4-((п-1-диметил-2-амино-2-карбоксиэтил)дитио)бутансульфурат, 2-ацетамидоэтил-2-ацетамидоэтантисолсульфанат и тригидрат натрий-4-меркаптобутансульфината.

Примеры химиотерапевтических агентов также включают иммунотерапевтические агенты, в том числе терапевтические антитела, подходящие для лечения пациентов, но не ограничиваются ими. Некоторые примеры терапевтических антител включают симтузумаб, абаговомаб, адекватумумаб, афутузумаб, алемтузумаб, альтумумаб, аматуксимаб, анатумумаб, арцитумумаб, бавитуксимаб, бектумумаб, бевацизумаб, биватузумаб, блинатумумаб, брентуксимаб, кантузумаб, катумаксомаб, цетуксимаб, цигатузумаб, циксутумумаб, кливатузумаб, конатумумаб, даратумумаб, дрозитумаб, дулиготумаб, дузигитумаб, детумумаб, дацетугумаб, далотугумаб, экромексимаб, элотугумаб, энситуксимаб, эртумаксомаб, этарацизумаб, фарлетугумаб, фиклатугумаб, фигитумумаб, фланвотумаб, футуксимаб, ганитумаб, гемтузумаб, гирентуксимаб, глембатумумаб, ибритутумаб, иговомаб, имгатузумаб, индатуксимаб, инотугумаб, интетугумаб, ипилимумаб, иратумумаб, лабетугумаб, лексатумумаб, линтузумаб, лорвотугумаб, лукатумумаб, мапатумумаб, матугумаб, миллатугумаб, минретумумаб, митумумаб, моксетумумаб, нарнатумаб, наптумомаб, нецитумумаб, нимотугумаб, нофетумумаб, окаратузумаб, офатумумаб, оларатумаб, онартузумаб, опортугумаб, ореговомаб, панитумумаб, парсатузумаб, патритумаб, пемтумумаб, пертузумаб, пинтумумаб, притумумаб, ракотумумаб, радретумаб, рилотумумаб, ритуксимаб, робатумумаб, сатумумаб, сибротузумаб, силтуксимаб, солитомаб, такатузумаб, таплитумумаб, тенатумумаб, тепротумумаб, тигатузумаб, тозитумумаб, трастузумаб, тукотугумаб, ублитуксимаб, велтузумаб, ворсетугумаб, вотумумаб, залутумумаб, СС49 и 3F8. Ритуксимаб может применяться для лечения индолентного В-клеточного рака, в том числе лимфомы маргинальной зоны, макроглобулинемии Вальденстрема (WM), ХЛЛ и мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы. В частности, эффективна комбинация ритуксимаба и агентов для химиотерапии.

Приведенные примеры терапевтических антител могут быть дополнительно помечены или скомбинированы с частицей-радиоизотопом, такой как индий-111, иттрий-90 или йод-131.

Согласно одному варианту реализации дополнительный терапевтический агент представляет собой алкилирующий агент - мустарген. Неограничивающие примеры алкилирующих агентов - мустаргенов включают хлорамбуцил.

Согласно одному варианту реализации соединения и композиции, описанные в настоящем документе, могут применяться вместе или быть скомбинированы с одним или более дополнительными терапевтическими агентами. Указанные один или более терапевтических агентов включают, не ограничиваясь перечисленными, ингибитор Abl, активированную киназу CDC (ACK), аденозиновый рецептор A2B

(A2B), киназу, регулирующую сигнал апоптоза (ASK), аврора-киназу, тирозинкиназу Брутона (BTK), бромодомен BET (BRD), такой как BRD4, c-Kit, c-Met, CDK-активирующую киназу (CAK), кальмодулин-зависимую протеинкиназу (CaMK), циклин-зависимую киназу (CDK), казеинкиназу (CK), рецептор домена дискоидина (DDR), рецепторы эпидермального фактора роста (рЭФР), киназу фокальной адгезии (FAK), Flt-3, FYN, киназу гликогенсинтазы (GSK), HCK, гистондеацетилазу (HDAC), IKK, такую как IKK β , изоцитратдегидрогеназу (ИДГ), такую как ИДГ1, Янус-киназу (JAK), KDR, лимфоцит-специфическую тирозиновую протеинкиназу (LCK), белок лизилоксидазу, подобный лизилоксидазе белок (LOXL), LYN, матриксную металлопротеиназу (MMP), MEK, митоген-активируемую протеинкиназу (МАРК), NEK9, NPM-ALK, киназу p38, тромбоцитарный фактор роста (ТРФ), киназу фосфорилазы (PK), Polo-подобную киназу (PLK), фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K), протеинкиназу (PK), такую как протеинкиназа A, B и/или C, PYK, тирозинкиназу селезенки (SYK), серин/треониновую киназу TPL2, серин/треониновую киназу STK, фактор передачи сигнала и транскрипции (STAT), SRC, серин/треониновую протеинкиназу (TBK), такую как TBK1, TIE, тирозинкиназу (TK), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), YES или любую комбинацию перечисленного.

Ингибиторы ASK включают ингибиторы ASK1. Примеры ингибиторов ASK1 включают описанные в WO 2011/008709 (Gilead Sciences) и WO 2013/112741 (Gilead Sciences), однако не ограничены ими.

Примеры ингибиторов BTK включают ибрутиниб, HM71224, ONO-4059 и CC-292, однако не ограничены перечисленными.

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

Примеры ингибиторов HDAC включают, не ограничиваясь перечисленными, прациностат и панобиностат.

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

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

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

Ингибиторы MMP включают ингибиторы MMP1-10. Примеры ингибиторов MMP9 включают, не ограничиваясь перечисленными, маримастат (BB-2516), ципемастат (Ro 32-3555), и описанные в WO 2012/027721 (Gilead Biologies).

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

Примеры ингибиторов PI3K γ включают, не ограничиваясь перечисленными, ZSTK474, AS252424, LY294002 и TG100115.

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

Примеры ингибиторов PI3K β включают, не ограничиваясь перечисленными, GSK2636771, BAY 10824391 и TGX221.

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

Примеры ингибиторов пан-PI3K включают, не ограничиваясь перечисленными, LY294002, BEZ235, XL147 (SAR245408) и GDC-0941.

Примеры ингибиторов SYK включают, не ограничиваясь перечисленными, таматиниб (R406), фос-таматиниб (R788), PRT062607, BAY-61-3606, NVP-QAB 205 AA, R112, R343; и описанные в патенте США №:8450321 (Gilead Connecticut).

TKI могут быть нацелены на рецепторы эпидермального фактора роста (рЭФР) и рецепторы фактора роста фибробластов (ФРФ), тромбоцитарного фактора роста (ТРФ) и фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС). Примеры TKI, нацеленных на рЭФР, включают, не ограничиваясь перечисленными, гефинитиниб и эрлотиниб. Сунитиниб представляет собой неограничивающий пример TKI, нацеленного на рецепторы ФРФ, ТРФ и ФРЭС.

Антитела против PD-L1 согласно настоящему описанию могут применяться, согласно некоторым

вариантам реализации, совместно с ингибитором иммунных контрольных точек. Контрольные точки иммунного ответа представляют собой молекулы иммунной системы, которые либо включают сигнал (костимулирующие молекулы), либо выключают сигнал (коингибиторные молекулы). Многие виды рака защищаются от иммунной системы, ингибируя Т-клеточный сигнал за счет агониста для коингибиторных молекул или антагониста для костимулирующих молекул. Агонист или антагонист контрольных точек иммунного ответа может способствовать остановке такого защитного механизма в клетках. Агонист или антагонист контрольных точек иммунного ответа может быть нацелен на любую одну или более из следующих молекул контрольных точек: PD-1, CTLA-4, LAG-3 (также известный как CD223), CD28, CD122, 4-1BB (также известный как CD137), TIM3, OX-40/OX40L, CD40/CD40L, LIGHT, ICOS/ICOSL, GITR/GITRL, TIGIT, CD27, VISTA, B7H3, B7H4, HEVМ или BTLA (также известный как CD272).

Белок программируемой смерти Т-клеток 1 (PD-1) представляет собой трансмембранный белок, обнаруживаемый на поверхности Т-клеток, связывание которого с лигандом программируемой смерти Т-клеток 1 (PD-L1) на опухолевых клетках приводит к подавлению Т-клеточной активности и снижению опосредованной Т-клетками цитотоксичности. Соответственно PD-1 и PD-L1 представляют собой понижающие регуляторы иммунной системы, или "выключатели" контрольных точек иммунного ответа. Примеры ингибиторов PD-1 включают, без ограничения, ниволумаб, (Опдиво) (BMS-936558), пембролизумаб (Китруда), пидилизумаб, AMP-224, MEDI0680 (AMP-514), PDR001, MPDL3280A, MEDI4736, BMS-936559 и MSB0010718C.

CTLA-4 представляет собой белковый рецептор, который понижающе регулирует иммунную систему. Неограничивающие примеры ингибиторов CTLA-4 включают ипилимумаб (Ервой) (также известный как BMS-734016, MDX-010, MDX-101) и тремелиумаб (ранее тицилиумаб, CP-675,206).

Ген активации лимфоцитов 3 (LAG-3) представляет собой рецептор контрольной точки иммунного ответа поверхности клеток, который функционирует, подавляя иммунный ответ за счет действия на клетки Treg, а также за счет прямых эффектов на CD8+ Т-клетки. Ингибиторы LAG-3 включают, без ограничения, LAG525 и BMS-986016.

CD28 конститутивно экспрессируется почти на всех CD4+ Т-клетках человека и примерно на половине всех CD8 Т-клеток, вызывая размножение Т-клеток. Неограничивающие примеры ингибиторов CD28 включают TGN1412.

CD122 повышает пролиферацию CD8+ эффекторных Т-клеток. Неограничивающие примеры включают NKTR-214.

4-1BB (также известный как CD137) вовлечен в пролиферацию Т-клеток. Известно также, что опосредованная CD137 сигнализация защищает Т-клетки и, в частности, CD8+ Т-клетки от индуцированной активацией клеточной смерти. Примерами ингибиторов CD137 являются PF-05082566, урелумаб (BMS-663513) и липокалин.

При применении любого из перечисленных выше вариантов комбинированного лечения антител против PD-L1 может вводиться одновременно с другим противораковым агентом или отдельно от него. При введении по отдельности антитело против PD-L1 может вводиться до или после другого противоракового агента.

Лечение инфекции.

Как продемонстрировано в экспериментальных примерах, антитела согласно настоящему описанию могут активировать иммунный ответ, который, соответственно, может быть полезен для лечения инфекции.

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

Антитела согласно настоящему описанию могут также применяться для лечения инфекционного заболевания, вызываемого микроорганизмом, или уничтожения микроорганизма путем нацеливания на указанный микроорганизм и иммунную клетку для осуществления элиминации указанного микроорганизма. Согласно одному аспекту указанный микроорганизм представляет собой вирус, в том числе РНК-вирусы и ДНК-вирусы, грамположительную бактерию, грамотрицательную бактерию, простейшее или грибок. Неограничивающие примеры инфекционных заболеваний и связанных с ними микроорганизмов приведены в табл. 4 ниже.

Таблица 4

Инфекционные заболевания и связанные с ними микроорганизмы- источники

Инфекционное заболевание	Микроорганизм-источник
Инфекция <i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Актиномикоз	<i>Actinomyces israelii</i> , <i>Actinomyces gerencseriae</i> и <i>Propionibacterium propionicus</i>
Африканская сонная болезнь (африканский трипаносомоз)	<i>Trypanosoma brucei</i>
СПИД (Синдром приобретенного иммунодефицита)	ВИЧ (Вирус иммунодефицита человека)
Амебиаз	<i>Entamoeba histolytica</i>
Анаплазмоз	Род <i>Anaplasma</i>
Сибирская язва	<i>Bacillus anthracis</i>
Инфекция <i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>
Аргентинская геморрагическая лихорадка	Вирус Хунин
Аскаридоз	<i>Ascaris lumbricoides</i>
Аспергиллез	Род <i>Aspergillus</i>
Астровирусная инфекция	Семейство <i>Astroviridae</i>
Бабезиоз	Род <i>Babesia</i>
Инфекция <i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
Бактериальная пневмония	Ряд бактерий
Бактериальный вагиноз (BV)	Ряд бактерий
Инфекция <i>Bacteroides</i>	Род <i>Bacteroides</i>
Балантидиоз	<i>Balantidium coli</i>
Инфекция <i>Baylisascaris</i>	Род <i>Baylisascaris</i>
ВК-вирусная инфекция	ВК-вирус
Черная пьедра	<i>Piedraia hortae</i>
Инфекция <i>Blastocystis hominis</i>	<i>Blastocystis hominis</i>
Бластомикоз	<i>Blastomyces dermatitidis</i>
Боливийская геморрагическая лихорадка	вирус Мачино
Инфекция <i>Borrelia</i>	Род <i>Borrelia</i>
Ботулизм (и детский ботулизм)	<i>Clostridium botulinum</i>
Бразильская геморрагическая лихорадка	Вирус Сэбиа
Бруцеллез	Род <i>Brucella</i>
Инфекция <i>Burkholderia</i>	Как правило, <i>Burkholderia cepacia</i> и другие виды <i>Burkholderia</i>
Язва Бурули	<i>Mycobacterium ulcerans</i>
Инфекция <i>Calicivirus</i> (Norovirus и Sapovirus)	Семейство <i>Caliciviridae</i>
Кампилобактериоз	Род <i>Campylobacter</i>
Кандидоз (монилиоз; молочница)	Как правило, <i>Candida albicans</i> и другие виды <i>Candida</i>
Болезнь кошачьих царапин	<i>Bartonella henselae</i>
Целлюлит	Как правило, <i>Streptococcus</i> из группы А и <i>Staphylococcus</i>
Болезнь Шагаса (американский трипаносомоз)	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Шанкронд	<i>Haemophilus ducreyi</i>
Ветряная оспа	Вирус ветряной оспы (VZV)
Хламидиоз	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Инфекция <i>Chlamydomydia pneumoniae</i>	<i>Chlamydomydia pneumoniae</i>
Холера	<i>Vibrio cholerae</i>
Хромобластомикоз	Как правило, <i>Fonsecaea pedrosoi</i>
Клонорхоз	<i>Clonorchis sinensis</i>
Инфекция <i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
Кокцидиомикоз	<i>Coccidioides immitis</i> и <i>Coccidioides posadasii</i>
Колорадская клещевая лихорадка (CTF)	Вирус колорадской клещевой лихорадки (CTFV)

Простуда (острый вирусный ринофарингит; острый ринит)	Как правило, <i>риновирусы</i> и <i>коронавирусы</i> .
Болезнь Крейцфельда-Якоба (CJD)	<i>Прион CJD</i>
Конго-крымская геморрагическая лихорадка (CCHF)	<i>Вирус Конго-крымской геморрагической лихорадки</i>
Криптококкоз	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Криптоспоридиоз	Род <i>Cryptosporidium</i>
Синдром larva migrans, кожная форма (CLM)	Как правило, <i>Ancylostoma braziliense</i> ; ряд других паразитов
Циклоспориоз	<i>Cyclospora cayetanensis</i>
Цистицеркоз	<i>Taenia solium</i>
Цитомегаловирусная инфекция	<i>Цитомегаловирус</i>
Лихорадка денге	<i>Вирусы Денге (DEN-1, DEN-2, DEN-3 и DEN-4) – Флавивирусы</i>
Диагностика	<i>Dientamoeba fragilis</i>
Дифтерия	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
Дифиллоботриоз	<i>Diphyllobothrium</i>
Дракункулез	<i>Dracunculus medinensis</i>
Геморрагическая лихорадка Эбола	<i>Ebolavirus (EBOV)</i>
Эхинококкоз	Род <i>Echinococcus</i>
Эрлихиоз	Род <i>Ehrlichia</i>
Энтеробиоз (инфекция острицами)	<i>Enterobius vermicularis</i>
Энтерококковая инфекция	Род <i>Enterococcus</i>
Энтеровирусная инфекция	Род <i>Энтеровирус</i>
Эпидемический тиф	<i>Rickettsia prowazekii</i>
Инфекционная эритема (пятая болезнь)	<i>Парвовирус B19</i>
Внезапная экзантема (шестая болезнь)	<i>Герпесвирус человека 6 (HHV-6) и Герпесвирус человека 7 (HHV-7)</i>
Фасциолопсиз	<i>Fasciolopsis buski</i>
Фасциолез	<i>Fasciola hepatica</i> и <i>Fasciola gigantica</i>
Фатальная семейная бессонница (FFI)	<i>Прион FFI</i>
Филяриоз	<i>Синергизм Filarioidea</i>
Пищевое отравление Clostridium perfringens	<i>Clostridium perfringens</i>
Инфекция свободноживущими амебами	<i>Ряд возбудителей</i>
Фузобактериальная инфекция	Род <i>Fusobacterium</i>
Газовая гангрена (кlostридиальный мышечный некроз)	Как правило, <i>Clostridium perfringens</i> ; другие виды <i>Clostridium</i>
Геотрихоз	<i>Geotrichum candidum</i>
Синдром Герстмана - Штраусслера - Шейнкера (GSS)	<i>Прион GSS</i>
Лямблиоз	<i>Giardia intestinalis</i>
Сап	<i>Burkholderia mallei</i>
Гнатостомоз	<i>Gnathostoma spinigerum</i> и <i>Gnathostoma hispidum</i>
Гонорея	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Паховая гранулема (донованоз)	<i>Klebsiella granulomatis</i>
Стрептококковая инфекция, группа А	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Стрептококковая инфекция, группа В	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Инфекция Haemophilus influenzae	<i>Haemophilus influenzae</i>

Синдром «рука-нога-рот» (HFMD)	Энтеровирусы, в основном вирус Коксаки А и энтеровирус 71 (EV71)
Хантавирусный легочный синдром (HPS)	Вирус Син Номбре
Инфекция <i>Helicobacter pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Гемолитико-уремический синдром (ГУС)	<i>Escherichia coli</i> O157:H7, O111 и O104:H4
Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС)	Семейство <i>Bunyaviridae</i>
Гепатит А	Вирус гепатита А
Гепатит В	Вирус гепатита В
Гепатит С	Вирус гепатита С
Гепатит D	Вирус гепатита D
Гепатит E	Вирус гепатита E
Простой герпес	Вирус простого герпеса 1 и 2 (HSV-1 и HSV-2)
Гистоплазмоз	<i>Histoplasma capsulatum</i>
Анкилостомозная инфекция	<i>Ancylostoma duodenale</i> и <i>Necator americanus</i>
Бокавирусная инфекция человека	Бокавирус человека (HBoV)
Эрлихиоз человека, вызванный <i>Ehrlichia ewingii</i>	<i>Ehrlichia ewingii</i>
Гранулоцитарный анаплазмоз человека (HGA)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>
Метапневмовирусная инфекция человека	Метапневмовирус человека (hMPV)
Моноцитарный эрлихиоз человека	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>
Инфекция папилломавирусом человека (HPV)	Папилломавирус человека (HPV)
Инфекция вирусом парагриппа человека	Вирус парагриппа человека (HPIV)
Гименолипедоз	<i>Hymenolepis nana</i> и <i>Hymenolepis diminuta</i>
Инфекционный мононуклеоз, вызванный вирусом Эпштейна-Барра (мононуклеоз)	Вирус Эпштейна-Барр (EBV)
Грипп	Семейство <i>Orthomyxoviridae</i>
Изоспороз	<i>Isospora belli</i>
Болезнь Кавасаки	Неизвестно; имеются данные, подтверждающие заразность
Кератит	Ряд возбудителей
Инфекция <i>Kingella kingae</i>	<i>Kingella kingae</i>
Куру	Прион Куру
Лихорадка Ласса	Вирус Ласса
Легионеллез (Болезнь легионеров)	<i>Legionella pneumophila</i>
Легионеллез (Понтиакская лихорадка)	<i>Legionella pneumophila</i>
Лейшманиоз	Род <i>Leishmania</i>
Проказа	<i>Mycobacterium leprae</i> и <i>Mycobacterium lepromatosis</i>
Лептоспироз	Род <i>Leptospira</i>
Листерия	<i>Listeria monocytogenes</i>
Болезнь Лайма (боррелиоз Лайма)	Как правило, <i>Borrelia burgdorferi</i> и другие виды <i>Borrelia</i>
Лимфатический филяриоз (элефантиаз)	<i>Wuchereria bancrofti</i> и <i>Brugia malayi</i>
Лимфоцитарный хориоменингит	Вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV)
Малярия	Род <i>Plasmodium</i>
Марбургская геморрагическая лихорадка (МГЛ)	Вирус Марбурга

Корь	<i>Вирус кори</i>
Мелниоз (болезнь Уитмора)	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
Менингит	<i>Ряд возбудителей</i>
Менингококковая инфекция	<i>Neisseria meningitidis</i>
Метагонимоз	Как правило, <i>Metagonimus yokagawai</i>
Микроспориоз	<i>Microsporidia phylum</i>
Контагиозный моллюск (MC)	<i>Вирус контагиозного моллюска (MCV)</i>
Свинка	<i>Вирус эпидемического паротита</i>
Крысиный сыпной тиф (эндемический сыпной тиф)	<i>Rickettsia typhi</i>
Микоплазменная пневмония	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Мицетом	Многочисленные виды бактерий (актиномицетом) и грибов (эумицетом)
Миаз	<i>Личинки паразитических мух из отряда двукрылых</i>
Неонатальный конъюнктивит (Офтальмия новорожденных)	Чаще всего <i>Chlamydia trachomatis</i> и <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
(Новый) вариант болезни Крейтцфельда-Якоба (vCJD, nvCJD)	<i>Прион vCJD</i>
Нокардиоз	Как правило, <i>Nocardia asteroides</i> и другие виды <i>Nocardia</i>
Онхоцеркоз (речная слепота)	<i>Onchocerca volvulus</i>
Паракокцидиомикоз (Южно-американский бластомикоз)	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Парагонимоз	Как правило, <i>Paragonimus westermani</i> и другие виды <i>Paragonimus</i>
Пастереллез	Род <i>Pasteurella</i>
Педикулез головы (головные вши)	<i>Pediculus humanus capitis</i>
Педикулез тела (нагельные вши)	<i>Pediculus humanus corporis</i>
Лобковый педикулез (Лобковые вши, площади)	<i>Phthirus pubis</i>
Воспалительное заболевание органов таза (ВЗОМТ)	<i>Ряд возбудителей</i>
Коклюш (судорожный кашель)	<i>Bordetella pertussis</i>
Чума	<i>Yersinia pestis</i>
Пневмококковая инфекция	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Пневмоцистная пневмония (ПП)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
Пневмония	<i>Ряд возбудителей</i>
Полиомиелит	<i>Полиовирус</i>
Инфекция превотеллами	Род <i>Prevotella</i>
Первичный амёбный менингоэнцефалит (ПАМ)	Как правило, <i>Naegleria fowleri</i>
Прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия	<i>Вирус JC</i>
Пситтакоз	<i>Chlamydophila psittaci</i>
Лихорадка Q	<i>Coxiella burnetii</i>
Бешенство	<i>Вирус бешенства</i>
Лихорадка укуса крысы	<i>Streptobacillus moniliformis</i> и <i>Spirillum minus</i>
Инфекция респираторно-синцитиальным вирусом	<i>Респираторно-синцитиальный вирус (RSV)</i>
Риноспориоз	<i>Rhinosporidium seeberi</i>

Риновирусная инфекция	Риновирус
Риккетсиозная инфекция	Род <i>Rickettsia</i>
Осповидный риккетсиоз	<i>Rickettsia akari</i>
Лихорадка долины Рифт (RVF)	Вирус лихорадки долины Рифт
Пятнистая лихорадка Скалистых гор (RMSF)	<i>Rickettsia rickettsii</i>
Ротавирусная инфекция	Ротавирус
Краснуха	Вирус краснухи
Сальмонеллез	Род <i>Salmonella</i>
SARS (тяжелый острый респираторный синдром)	Коронавирус SARS
Чесотка	<i>Sarcoptes scabiei</i>
Шистосомоз	Род <i>Schistosoma</i>
Сепсис	Ряд возбудителей
Шигеллез (бациллярная дизентерия)	Род <i>Shigella</i>
Опоясывающий лишай (Herpes zoster)	Вирус ветряной оспы (VZV)
Натуральная оспа (вариола)	<i>Variola major</i> или <i>Variola minor</i>
Споротрихоз	<i>Sporothrix schenckii</i>
Стафилококковое пищевое отравление	Род <i>Staphylococcus</i>
Стафилококковая инфекция	Род <i>Staphylococcus</i>
Стронгилоидоз	<i>Strongyloides stercoralis</i>
Сифилис	<i>Treponema pallidum</i>
Тениоз	род <i>Taenia</i>
Тетанус (столбняк)	<i>Clostridium tetani</i>
<i>Tinea barbae</i> – дерматомикоз бороды и усов (парикмахерская сыпь)	Как правило, род <i>Trichophyton</i>
<i>Tinea capitis</i> (дерматомикоз волосистой части головы)	Как правило, <i>Trichophyton tonsurans</i>
<i>Tinea corporis</i> (дерматомикоз гладкой кожи)	Как правило, род <i>Trichophyton</i>
<i>Tinea cruris</i> (паховый дерматомикоз)	Как правило, <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> и <i>Trichophyton mentagrophytes</i>
<i>Tinea manuum</i> (дерматомикоз кожи рук)	<i>Trichophyton rubrum</i>
<i>Tinea nigra</i> (чёрный лишай)	как правило, <i>Hortaea werneckii</i>
Дерматофития стоп (стопа атлета)	как правило, род <i>Trichophyton</i>
<i>Tinea unguium</i> (онихомикоз)	как правило, род <i>Trichophyton</i>
<i>Tinea versicolor</i> (отрубевидный лишай)	Род <i>Malassezia</i>
Токсокароз (Глазная форма синдрома larva migrans (OLM))	<i>Toxocara canis</i> или <i>Toxocara cati</i>
Токсокароз (Висцеральная форма синдрома larva migrans (VLM))	<i>Toxocara canis</i> или <i>Toxocara cati</i>
Токсоплазмоз	<i>Toxoplasma gondii</i>
Трихинеллез	<i>Trichinella spiralis</i>
Трихомоноз	<i>Trichomonas vaginalis</i>
Трихуроз (инфекция власоглавом)	<i>Trichuris trichiura</i>
Туберкулез	Как правило, микобактериальный туберкулез
Туляремия	<i>Francisella tularensis</i>
Инфекция <i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
Венесуэльский энцефалит лошадей	Вирус венесуэльского энцефалита лошадей
Венесуэльская геморрагическая лихорадка	вирус Гуанарито
Вирусная пневмония	Различные вирусы
Лихорадка Западного Нила	Вирус Западного Нила
Белая пьедра (<i>Tinea blanca</i>)	<i>Trichosporon beigelii</i>
Инфекция <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
Иерсиниоз	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Желтая лихорадка	Вирус желтой лихорадки
Зигомикоз	Порядок <i>Mucorales</i> (мукоромикоз) и <i>Entomophthorales</i> (энтомофторамикоз)

Конкретные дозировка и схема лечения для конкретного пациента зависят от различных факторов, в том числе от конкретных используемых антител, их вариантов или производных, возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола и рациона питания пациента; времени введения, скорости выведения, комбинаций лекарственных средств и тяжести конкретного заболевания, лечение которого проводится. Оценка таких факторов медицинскими работниками входит в обычную компетенцию для данной области техники. Количество также зависит от индивидуального пациента, подлежащего лечению, маршрута введения, типа состава, характеристик используемого соединения, тяжести заболевания и требуемого эффекта. Количество для использования может быть определено с применением фармакологических и фармакокинетических принципов, хорошо известных в данной области техники.

Способы введения антител или их вариантов включают, не ограничиваясь перечисленными, внутривенный, внутримышечный, внутривагинальный, внутриванный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный маршруты. Антигенсвязывающие полипептиды или композиции могут быть введены любым удобным способом, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорб-

ции через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.п.), а также могут быть введены совместно с другие биологически активными агентами. Соответственно фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие полипептиды согласно настоящему описанию, могут быть введены перорально, ректально, парентерально, интрацестерально, интравагинально, внутривнутрибрюшинно, местно (например, путем применения порошков, мазей, капель или трансдермального пластыря), буккально или в виде перорального или назального спрея.

Термин "парентеральный" в настоящем документе относится к способам введения, включающим внутривенные, внутримышечные, внутривнутрибрюшинные, интрацестеральные, подкожные и внутрисуставные инъекции и инфузии.

Введение может быть системным или местным. Кроме того, может быть желательным введение антител согласно настоящему описанию в центральную нервную систему любым подходящим маршрутом, в том числе путем интравентрикулярных и интратекальных инъекций; для облегчения интравентрикулярной инъекции может быть использован интравентрикулярный катетер, например, присоединенный к резервуару, такому как резервуар Оммайя. Может также применяться легочное введение, например, с помощью ингалятора или небулайзера, и в составах с аэрозольным агентом.

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

Согласно другому варианту реализации указанные антитела или композиция могут быть доставлены в везикуле, в частности, в липосоме (см. Langer, 1990, Science, 249:1527-1533; Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, p. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, там же, p. 317-327; см. там же в целом).

Согласно еще одному варианту реализации указанные антигенсвязывающий полипептид или композиция могут быть доставлены в системе контролируемого высвобождения. Согласно одному варианту реализации может применяться насос (см. Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al., 1980, Surgery, 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med., 321:574). Согласно другому варианту реализации могут применяться полимерные материалы (см. источники Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem., 23:61; see also Levy et al., 1985, Science, 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol., 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg., 71:105). Согласно еще одному варианту реализации система для контролируемого высвобождения может быть размещена поблизости от терапевтической мишени, т.е. головного мозга, соответственно, требуется только часть системной дозы (см., например, Goodson, в работе "Medical Applications of Controlled Release", см. выше, т. 2, с. 115-138 (1984)). Другие системы для контролируемого высвобождения описаны в обзоре Langer (1990, Science, 249:1527-1533).

Согласно конкретному варианту реализации, если композиция согласно настоящему описанию содержит нуклеиновую кислоту или полинуклеотид, кодирующую(ий) белок, указанная нуклеиновая кислота может быть введена *in vivo* для стимуляции экспрессии кодируемого белка, путем ее конструирования как части подходящего нуклеиновокислотного экспрессионного вектора и введения таким образом, что она становится внутриклеточной, например, с применением ретровирусного вектора (см. патент США № 4980286), или путем прямой инъекции, или применения бомбардировки микрочастицами (например, с применением генной пушки; биолистика, Dupont), или покрытия липидами, или применения рецепторов клеточной поверхности, или агентов для трансфекции, или путем введения в связанном виде с гомеобоксподобным пептидом, который, как известно, проникает в ядро (см., например, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:1864-1868), и т.п. Как вариант, нуклеиновая кислота может быть введена внутриклеточно и включена в состав ДНК клетки-хозяина для экспрессии за счет гомологичной рекомбинации.

Количество антител согласно настоящему описанию, которое будет эффективным при лечении, ингибировании и предотвращении воспалительного, иммунного или злокачественного заболевания, расстройства или состояния может быть определено с применением стандартных клинических методик. Кроме того, могут необязательно применяться анализы *in vitro*, помогающие идентифицировать оптимальные диапазоны доз. Точная доза для применения в составе также зависит от маршрута введения и серьезности заболевания, расстройства или состояния, и должна быть выбрана на основании мнения лечащего врача и обстоятельств каждого пациента. Эффективные дозы могут быть выведены путем экстраполяции из кривых зависимости ответа от дозы, полученных *in vitro* или в модельных тестовых системах на животных.

В общем случае, вводимая пациенту доза антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему описанию составляет, как правило, от 0,1 до 100 мг/кг массы тела пациента, от 0,1 до 20 мг/кг массы тела пациента или от 1 до 10 мг/кг массы тела пациента. Обычно антитела человека имеют большее время полужизни в организме человека по сравнению с антителами других видов из-за иммунного ответа на чужеродные полипептиды. Соответственно для антител человека часто возможно использование более низких дозировок и менее частое введение. Кроме того, дозировка и частота введения антител согласно настоящему описанию может быть снижена за счет усиления поглощения и проникновения антител в ткани (например, в головной мозг) путем модификаций, таких как, например, липидизация.

Способы лечения инфекционного или злокачественного заболевания, состояния или расстройства, включающие введение антитела, его варианта или производного согласно настоящему описанию, как правило, тестируют на требуемую терапевтическую или профилактическую активность *in vitro*, а затем *in vivo* в приемлемой модели на животных перед применением у человека. Подходящие модели на животных, в том числе трансгенных животных, хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, анализы *in vitro* для демонстрации терапевтической полезности антигенсвязывающего полипептида, описанного в настоящем документе, включают анализ эффекта антигенсвязывающего полипептида на линию клеток или образец ткани пациента. Эффект антигенсвязывающего полипептида на линию клеток и/или образец ткани может быть определен с использованием методик, известных специалистам в данной области техники, таких как анализы, описанные в различных разделах настоящего документа. В соответствии с настоящим описанием анализы *in vitro*, которые могут быть использованы для определения того, показано ли введение специфического антигенсвязывающего полипептида, включают анализы клеточной культуры *in vitro*, когда культивируют образец ткани пациента и воздействуют на него соединением или иным образом вводят соединение, после чего наблюдают эффект такого соединения на образец ткани.

Различные системы доставки известны и могут применяться для введения антитела согласно настоящему описанию или полинуклеотида, кодирующего антитело согласно настоящему описанию, например, инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать указанное соединение, рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem., 262:4429-4432), конструирование нуклеиновой кислоты в виде части ретровирусного или другого вектора и т.п.

Способы диагностики.

Избыточная экспрессия PD-L1 наблюдается в образцах определенных опухолей, и пациенты с избыточно экспрессирующими PD-L1 клетками, предположительно будут отвечать на лечение антителами против PD-L1 согласно настоящему описанию. Соответственно антитела согласно настоящему описанию могут также применяться с диагностической и прогностической целью.

Образец, который предпочтительно включает клетку, может быть получен от пациента, который может представлять собой пациента с раком или пациента, которому необходимо поставить диагноз. Указанная клетка представляет собой клетку из опухолевой ткани или опухолевого блока, образца крови, образца мочи или любого образца от пациента. После необязательной предварительной обработки образца указанный образец может быть инкубирован с антителом согласно настоящему описанию в условиях, позволяющих указанному антителу взаимодействовать с белком PD-L1, потенциально присутствующим в образце. Для обнаружения присутствия белка PD-L1 в образце можно применять такие методы, как ИФА ELISA, используя антитело против PD-L1.

Присутствие белка PD-L1 в образце (необязательно с определением количества или концентрации) может быть использовано для диагностики рака, как показатель того, что пациент подходит для лечения указанным антителом, или как показатель того, что пациент прореагировал (или не прореагировал) на лечение рака. В случае способа диагностики детекция может быть выполнена однократно, два или более раз, на определенных стадиях, после начала лечения рака для определения прогресса лечения.

Композиции.

Согласно настоящему изобретению также предложены фармацевтические композиции. Такие композиции содержат эффективное количество антитела и приемлемый носитель. Согласно некоторым вариантам реализации указанная композиция дополнительно включает второй противораковый агент (например, ингибитор иммунных контрольных точек).

Согласно конкретному варианту реализации термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный контрольным органом федерального или государственного правительства, или указанный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, конкретнее, у человека. Кроме того, "фармацевтически приемлемый носитель" обычно представляет собой нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательный рецептурный агент любого типа.

Термин "носитель" относится к разбавителю, адъюванту, вспомогательному веществу или основе, с которыми вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, например, арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжут-

ное масло и т.п. Вода представляет собой предпочтительный носитель, если фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Также в качестве жидких носителей могут применяться солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина, в частности, для инъектируемых растворов. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, обезжиренное сухое молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и т.п. Указанная композиция, если это требуется, может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов, или pH-буферирующие агенты, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты. Также включены антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или натрия бисульфит; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; и агенты для коррекции тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Указанные композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов для продолжительного высвобождения и т.п. Указанная композиция может быть введена в состав суппозитория с традиционными связывающими веществами и носителями, такими как триглицериды. Состав для перорального применения может включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния фармацевтического качества и т.п. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в источнике: Remington's Pharmaceutical Sciences, ред. E. W. Martin, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Такие композиции содержат терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего полипептида, предпочтительно в очищенной форме, совместно с количеством носителя, подходящим для обеспечения формы для надлежащего введения указанному пациенту. Указанный состав должен соответствовать способу введения. Исходный состав может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы, изготовленные из стекла или пластика.

Согласно варианту реализации состав с указанной композицией получают в соответствии с обычными процедурами для фармацевтической композиции, предназначенной для внутривенного введения человеку. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости указанная композиция может также включать солюбилизующий агент и местный анестетик, такой как лидокаин для уменьшения болезненности в месте инъекции. Обычно указанные ингредиенты либо представлены отдельно, либо смешаны в составе единичной лекарственной формы, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше с указанием количества активного агента. Если композиция предназначена для введения путем инфузии, она может отпущаться с инфузионным флаконом, содержащем стерильную воду фармацевтического качества или солевой раствор. Если композицию вводят путем инъекции, может быть предоставлена ампула со стерильной водой для инъекций или солевым раствором, чтобы можно было смешать ингредиенты перед введением.

Соединения согласно настоящему описанию могут быть введены в состав в нейтральной форме или в форме соли. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные анионами, например, происходящими из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислоты и т.п., и образованные катионами, например, происходящими из гидроксида натрия, калия, аммония, кальция, железа (III), изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.п.

Примеры

Пример 1. Получение моноклональных антител человека против PD-L1 человека.

Получали моноклональные антитела мыши против PD-L1 человека с применением гибридомной технологии.

Антиген: высокоэкспрессирующая белок PDL1-Fc человека и PD-L1 человека линия клеток CHOK1 (линия клеток PDL1-CHOK1).

Иммунизация: для получения моноклональных антител мыши к PD-L1 человека 6-8-недельных самок мышей BALB/c сначала иммунизировали $1,5 \times 10^7$ клеток PDL1-CHOK1. На 14 день и 33 день после первой иммунизации иммунизированных мышей повторно иммунизировали $1,5 \times 10^7$ клетками PDL1-CHOK1 соответственно. Для отбора мышей, продуцирующих антитела, которые связывают белок PD-L1, сыворотку от иммунизированных мышей тестировали с применением ИФА ELISA. Вкратце микротитрационные планшеты покрывали белком PD-L1 человека в концентрации 1 мкг/мл в ФСБ, внося по 100 мкл/лунку при комнатной температуре (КТ), в течение ночи, после чего блокировали 100 мкл/лунку 5% БСА. Разведения плазмы от иммунизированных мышей добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1-2 ч при КТ. Планшеты промывали ФСБ/Tween, а затем инкубировали с антителом против IgG мыши, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 1 ч при КТ. После промывания планшеты проявляли субстратом ABTS и анализировали на спектрофотометре при OD 405 нм. Мышам с достаточными титрами IgG против PDL1 вводили бустерную дозу 50 мкг белка PDL1-Fc человека на день 54 после иммунизации. Итоговых отобранных мышей использовали для проведения слияния. Супернатанты гибридом тестировали на IgG против PD-L1 с применением ИФА ELISA.

Клоны гибридомы HL1210-3, HL1207-3, HL1207-9 и HL1120-3 были выбраны для дальнейшего анализа. Последовательности аминокислот и полинуклеотидов вариабельных областей HL1210-3 приведены в табл. 5 ниже.

Таблица 5

Вариабельные последовательности HL1210-3		
Название	Последовательность	SEQ ID NO:
HL1210-3 VH	GAAGTGAAGTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGC CTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT	112
	CACTTTCAGTAGCTATGACATGTCTTGGGTTCGCCAGACT CCGGAGAAGAGTCTGGAGTGGGTCCGAACCATTAGTGATG GTGGTGGTTACATCTACTATTAGACAGTGTGAAGGGGCG ATTTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTAC CTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCTTGT ATATTTGTGCAAGAGAATTGGTAAGCGCTATGCTTTGGA CTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA	
HL1210-3 VH	EVKLVESSGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYDMSWVRQT PEKSLEWVATISDGGGYIYSDSVKGRFTISRDNKNNLY LQMSSLRSEDTALYICAREFGKRYALDYWGQGTSTVT	113
HL1210-3 VL	GACATGTGTGATGACCCAGTCTCACAATTCATGTCCACAT CGGTAGGAGACAGGGTCAAGTCTCCTGCAAGGCCAGTCA GGATGTGACTCCTGCTGTGCGCTGGTATCAACAGAAGCCA GGACAATCTCCTAACTACTGATTTACTCCACATCCTCCC GGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATC TGGGACGGATTCTACTTTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCT GAAGACCTGGCAGTTTATTAAGTGTGAGCAACATTATACTA CTCCGCTCACGTTCCGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAA A	114
HL1210-3 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI SCKASQDVT PAVAWYQQKP GQSPKLLIYSTSSRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA EDLAVYYCQOHYTTPLTFGAGTKLELK	115

Пример 2. Активность связывания PD-L1 человека моноклональным антителом мыши HL1210-3.

Для оценки активности связывания клон гибридомы HL1210-3 проводили тестирование очищенного из указанного клон mAb методом ИФА ELISA. Вкратце микротитрационные планшеты покрывали белком PD-L1-Fc человека в концентрации 0,1 мкг/мл в ФСБ, внося по 100 мкл/лунку при 4°C в течение ночи, после чего блокировали 100 мкл/лунку 5% БСА. 3-кратные разведения антител HL1210-3, начиная с 0,2 мкг/мл, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1-2 ч при КТ. Планшеты промывали ФСБ/Тween, а затем инкубировали с антителом козы против IgG мыши, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 1 ч при КТ. После промывания планшеты проявляли с субстратом ТМВ и анализировали на спектрофотометре при OD 450-630 нм. Как показано на фиг. 1, HL1210-3 может связываться с PD-L1 человека с высокой активностью ($EC_{50}=5,539$ нг/мл).

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

Анализ блокирования рецепторов при применении рекомбинантного PD-L1 человека.

Для оценки блокирующего эффекта mAb мыши HL1210-3 на связывание рекомбинантного PD-L1 человека с его рецептором PD-1 применяли анализ блокирования рецепторов на основе ИФА ELISA. Вкратце микротитрационные планшеты покрывали белком PD-L1-Fc человека в концентрации 1 мкг/мл в ФСБ, внося по 100 мкл/лунку, при 4°C в течение ночи, после чего блокировали 100 мкл/лунку 5% БСА. По 50 мкл меченого биотином белка PD-1-Fc человека и по 50 мкл 3-кратных разведений антител HL1210-3, начиная с 2 мкг/мл, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Планшеты промывали ФСБ/Тween, после чего инкубировали со стрептавидином-HRP в течение 1 ч при 37°C. После промывания планшеты проявляли с субстратом ТМВ и анализировали на спектрофотометре при OD 450-630 нм. Как показано на фиг. 2, HL1210-3 может эффективно ингибировать связывание PD-L1 человека с PD1 человека при $IC_{50}=0,7835$ нМ.

Анализ блокирования рецепторов при применении экспрессируемого клетками млекопитающих PD-L1 человека.

Для оценки блокирующего эффекта mAb мыши HL1210-3 на связывание PD-L1 человека, экспрессируемого на клетках млекопитающих, с его рецептором PD-1, применяли анализ блокирования рецепторов на основе метода FACS. Вкратце клетки PDL1-CHOK1 сначала инкубировали с 3-кратными серийными разведениями mAb мыши HL1210-3, начиная с 20 мкг/мл, при КТ в течение 1 ч. После промывания буфером для FACS (ФСБ с 2% ФБС) в каждую лунку добавляли меченые биотином huPD-1 и инкубировали при КТ в течение 1 ч. Затем, после двукратного промывания буфером для FACS, добавляли в каждую лунку стрептавидин-ФЭ в течение 0,5 ч. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) ФЭ оценивали с использованием FACS AriaIII. Как показано на фиг. 3, антитело HL1210-3 может высокоэффективно ингибировать связывание PD-1 на PD-L1, экспрессируемым на клетках млекопитающих, при IC_{50} , равным 2,56 нМ, с 92,6% максимальным показателем ингибирования.

$$\% \text{ ингибирования} = \left(1 - \frac{\text{MFI тестируемого антитела}}{\text{MFI контроля-основы}} \right) \times 100\%$$

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

Для оценки эффекта mAb мыши HL1210-3 оценивали ответ Т-клеток человека в условиях реакции смешанной культуры лимфоцитов. Проводили дифференцировку ДК человека из CD14+ моноцитов в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4 на протяжении 7 дней. Затем CD4+ Т-клетки, выделенные от другого донора, культивировали совместно с ДК и серийными разведениями блокирующего антитела против PD-L1. На 5 день после инокуляции анализировали продуцирование ИФН- γ в культуральном супернатанте. Результаты показали, что антитела HL1210-3 могут дозозависимым образом стимулировать продуцирование ИФН- γ , что предполагает способность антитела против PD-L1 стимулировать ответ Т-клеток человека (фиг. 4).

Пример 5. Аффинность связывания mAb мыши HL1210-3.

Связывание антител HL1210-3 с рекомбинантным белком PD-L1 (PD-L1 человека с His-меткой) тестировали в системе BIACORE™ с применением способа захвата. mAb мыши HL1210-3 захватывали с применением антитела против Fc мыши, которым покрывали CM5-чип. Серийные разведения белка PD-L1 человека с His-меткой вводили поверх захваченного антитела в течение 3 мин при скорости потока 25 мкг/мл. Позволяли антигену диссоциировать в течение 900 с. Указанный эксперимент полностью проводили на Biacore T200. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения для оценки Biacore T200. Результат представлен на фиг. 5 и в табл. 6 ниже.

Таблица 6

Кинетика связывания HL1210-3 с рекомбинантным PD-L1 человека

Антитело	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)
HL1210-3	1,61E+05	4,69E-05	2,93E-10

Пример 6. Гуманизация mAb мыши HL1210-3.

Гены варибельных областей mAb HL1210-3 использовали для создания гуманизированного mAb. На первом этапе указанного процесса последовательности аминокислот VH и VK из MAb HL1210-3 сравнивали с генными последовательностями Ig человека из доступной базы данных для обнаружения в целом наилучшим образом совпадающих генных последовательностей зародышевой линии Ig человека. Для легкой цепи наилучшее совпадение среди последовательностей человека было обнаружено для генов O18/Jk2 и KV1-39*01/KJ2*04, а для тяжелой цепи наилучшее совпадение среди последовательностей человека обнаружено для гена VH3-21. Были также выбраны гены VH3-11, VH3-23, VH3-7*01 и VH3-48 ввиду их значительного совпадения.

Затем разрабатывали гуманизированные последовательности варибельных доменов, в которых CDR1 (SEQ ID NO: 4), 2 (SEQ ID NO: 5) и 3 (SEQ ID NO: 6) легкой цепи HL1210-3 были привиты на каркасные последовательности генов O18/Jk2 и KV1-39*01/KJ2*04, а последовательности CDR1 (SEQ ID NO: 1), 2 (SEQ ID NO: 2) и 3 (SEQ ID NO: 3) из HL1210-3 VH были привиты на каркасные последовательности гена VH3-21, VH3-11, VH3-23, VH3-48 или VH3-7*01. Затем создавали трехмерную модель, чтобы определить, может ли замена аминокислоты мыши на аминокислоту человека в каких-либо положениях каркасной области повлиять на связывание и/или конформацию CDR. Для легкой цепи были идентифицированы 22S, 43S, 60D, 63T и 42Q (нумерация по Kabat; см. табл. 7) в каркасной области. В случае тяжелой цепи в обратные мутации были вовлечены 1E, 37V, 40T, 44S, 49A, 77N, 91I, 94R и 108T в каркасной области.

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

Последовательности аминокислот и нуклеотидов некоторых из гуманизированных антител перечислены в табл. 8 ниже.

Таблица 8

Последовательности гуманизированных антител (жирным шрифтом выделены области CDR)

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
HL1210-VH	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFS SYDMS WVRQTPEKSLEWVAT ISDGGGYIYYSDSVKGRFTI SRDNAKNNLYLQMSSLRSEDALYICARE EF GKRYALDY WGQGTSTVTVSS	7
Hu1210 VH.1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WVRQAPGKGLEWVST ISDGGGYIYYSDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE EF GKRYALDY WGQGTSTVTVSS	8
Hu1210 VH.1a	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WVRQAPGKGLEWVAT ISDGGGYIYYSDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE EF GKRYALDY WGQGTSTVTVSS	9
Hu1210 VH.1b	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WVRQAPGKSLEWVAT ISDGGGYIYYSDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYICARE EF GKRYALDY WGQGTSTVTVSS	10
Hu1210 VH.2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WIRQAPGKGLEWVST ISDGGGYIYYSDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE EF GKRYALDY WGQGTSTVTVSS	11
Hu1210 VH.2a	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WIRQAPGKGLEWVAT ISDGGGYIYYSDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE EF GKRYALDY WGQGTSTVTVSS	12
Hu1210 VH.2b	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WVRQAPGKSLEWVAT ISDGGGYIYYSDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYICARE EF GKRYALDY WGQGTSTVTVSS	13
Hu1210 VH.3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WVRQAPGKGLEWVST ISDGGGYIYYSDSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE EF GKRYALDY WGQGTSTVTVSS	14
Hu1210 VH.3a	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WVRQAPGKSLEWVAT ISDGGGYIYYSDSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICARE EF GKRYALDY WGQGTSTVTVSS	15
Hu1210 VH.4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WVRQAPGKGLEWVST ISDGGGYIYYSDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARE EF GKRYALDY WGQGTSTVTVSS	16
Hu1210 VH.4a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WVRQAPGKGLEWVAT	17

	ISDGGGYIYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAREF GKRYALDYWGQGTTVTVSS	
Hu1210 VH.4b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQAPGKSLEWVAT ISDGGGYIYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREF GKRYALDYWGQGTTVTVSS	18
Hu1210 VH.4c	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQAPGKSLEWVAT ISEGGGYIYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREF GKRYALDYWGQGTTVTVSS	19
Hu1210 VH.4d	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQAPGKSLEWVAT ISDAGGYIYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREF GKRYALDYWGQGTTVTVSS	20
Hu1210 VH.4e	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQAPGKSLEWVAT ISDVGGYIYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREF GKRYALDYWGQGTTVTVSS	21
Hu1210 VH.5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQAPGKLEWVAT ISDGGGYIYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREF GKRYALDYWGQGTTLTVSS	22
HU1210 VH.5a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQAPGKLEWVAT ISDGGGYIYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYICAREF GKRYALDYWGQGTTLTVSS	23
HU1210 VH.5b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQAPGKLEWVAT ISDGGGYIYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYICAREF GKRYALDYWGQGTTVTVSS	24
HU1210 VH.5C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQAPGKLEWVAT ISDGGGYIYSDSVKGRFTISRDNAKNNLYLQMNSLRAEDTAVYICAREF GKRYALDYWGQGTTLTVSS	25
HU1210 VH.5d	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQTPEKSLEWVAT ISDGGGYIYSDSVKGRFTISRDNAKNNLYLQMNSLRAEDTAVYICAREF GKRYALDYWGQGTTLTVSS	26
HL1210-VK	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI CKASQDVTPAVAWYQQKPGQSPKLLIYS TSSRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYTTP LTFGA GTKLELK	27
Hu1210 VK.1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQDVTPAVAWYQQKPGKAPKLLIYS TSSRYTGVPSSRFSGSGSDFTFTISSLPEDATYYCQQHYTTP LTFGQ GTKLEIK	28
Hu1210 VK.1a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQDVTPAVAWYQQKPGKSPKLLIYS TSSRYTGVPSSRFSGSGSDFTFTISSLPEDATYYCQQHYTTP LTFGQ GTKLEIK	29
Hu1210 Vk.2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQDVTPAVAWYQQKPGKAPKLLIYS TSSRYTGVPSSRFSGSGSDFTLTISSLPEDFATYYCQQHYTTP LTFGQ GTKLEIKR	30
Hu1210 Vk.2a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQDVTPAVAWYQQKPGKAPKLLIYS TSSRYTGVPDRFTGSGSGDFTLTISSLPEDFATYYCQQHYTTP LTFGQ GTKLEIKR	31
Hu1210 Vk.2b	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQDVTPAVAWYQQKPGQSPKLLIYS TSSRYTGVPDRFTGSGSGDFTLTISSLPEDFATYYCQQHYTTP LTFGQ GTKLEIKR	32
Hu1210 Vk.2c	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIS CKASQDVTPAVAWYQQKPGQSPKLLIYS TSSRYTGVPDRFTGSGSGDFTLTISSLPEDFATYYCQQHYTTP LTFGQ GTKLEIKR	33

HL1210 VH	GAGGTGAAGCTGGTGGAGAGCGGGCGGAGATCTGGTGAAGCCTGGCGGCAGCCTGAAGCTG AGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCTGGGTGAGGCAGACC CCCAGAAAGGCTGGAGTGGGTGGCCACCATCAGCGATGGCGGCGGCTACATCTACTAC AGCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACACCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTCTGCGCCAGGGAGTTC GGCAAGAGGTACGCCCTGGACTACTGGGGACAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGC	34
Hu1210 VH.1	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGGAGGAGGACTGGTGAAGCCCGGAGGCAGCCTGAGACTG AGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCC CCTGGCAAAGGCTGGAGTGGGTGAGCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTC GGCAAAGGTACGCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	35
Hu1210 VH.1a	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGGAGGAGGACTGGTGAAGCCCGGAGGCAGCCTGAGACTG AGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCC CCTGGCAAAGGCTGGAGTGGGTGGCCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTC GGCAAAGGTACGCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	36
Hu1210 VH.1b	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGGAGGAGGACTGGTGAAGCCCGGAGGCAGCCTGAGACTG AGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCC CCTGGCAAAGGCTGGAGTGGGTGGCCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTC GGCAAAGGTACGCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	37
Hu1210 VH.2	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGGAGGAGGACTGGTGAAGCCCGGAGGCAGCCTGAGACTG AGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCC CCTGGCAAAGGCTGGAGTGGGTGAGCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTC GGCAAAGGTACGCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	38
Hu1210 VH.2a	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGGAGGAGGACTGGTGAAGCCCGGAGGCAGCCTGAGACTG AGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCC CCTGGCAAAGGCTGGAGTGGGTGGCCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTC GGCAAAGGTACGCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	39
Hu1210 VH.2b	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGGAGGAGGACTGGTGAAGCCCGGAGGCAGCCTGAGACTG AGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCC CCTGGCAAAGGCTGGAGTGGGTGGCCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTC GGCAAAGGTACGCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	40
Hu1210 VH.3	GAGGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGGAGGAGGACTGGTGCAACCCCGGAGGCAGCCTGAGACTG AGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCC CCTGGCAAAGGCTGGAGTGGGTGAGCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACACCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTC GGCAAAGGTACGCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	41
Hu1210 VH.3a	GAGGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGGAGGAGGACTGGTGCAACCCCGGAGGCAGCCTGAGACTG AGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCC CCTGGCAAAGGCTGGAGTGGGTGGCCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACACCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTC GGCAAAGGTACGCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	42

	GGCAAAGGTACGCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	
Hu1210 VH.4	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAACCCGGAGGCAGCCTGAGACTG AGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCC CCTGGCAAAGGCCCTGGAGTGGGTGAGCACCATCTCCGATGGCGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGATGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTC GGCAAAGGTACGCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	43
Hu1210 VH.4a	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAACCCGGAGGCAGCCTGAGACTG AGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCC CCTGGCAAAGGCCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCTCCGATGGCGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGATGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTC GGCAAAGGTACGCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	44
Hu1210 VH.4b	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAACCCGGAGGCAGCCTGAGACTG AGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCC CCTGGCAAAGGCCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCTCCGATGGCGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGATGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTC GGCAAAGGTACGCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	45
Hu1210 VH.4c	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAACCCGGAGGCAGCCTGAGACTG AGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCC CCTGGCAAAGGCCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCTCCGAGGCGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGATGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTC GGCAAAGGTACGCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	46
Hu1210_VH.4 d	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAACCCGGAGGCAGCCTGAGACTG AGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCC CCTGGCAAAGGCCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCTCCGATGCGGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGATGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTC GGCAAAGGTACGCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	47
Hu1210_VH.4 e	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAACCCGGAGGCAGCCTGAGACTG AGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCC CCTGGCAAAGGCCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCTCCGATGTTGGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGATGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTC GGCAAAGGTACGCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	48
Hu1210 VH.5	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTGCAACCTGGAGGCTCCCTGAGGCTG TCCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGCTCCTACGATATGAGCTGGGTGAGGCAGGCT CCTGGAAAGGCCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCTCCGACGGAGGCGGCTACATCTACTAC TCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTAC CTGCAGATGAACTCTCTCAGGGCTGAGGACACCGCCGTGTATTACTGCGCCAGGGAGTTC GGCAAGAGGTACGCCCTGGATTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTGAGCTCC	49
Hu1210 VH.5a	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTGCAACCTGGAGGCTCCCTGAGGCTG TCCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGCTCCTACGATATGAGCTGGGTGAGGCAGGCT CCTGGAAAGGCCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCTCCGACGGAGGCGGCTACATCTACTAC TCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTAC CTGCAGATGAACTCTCTCAGGGCTGAGGACACCGCCGTGTATATCTGCGCCAGGGAGTTC GGCAAGAGGTACGCCCTGGATTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTGAGCTCC	50
Hu1210 VH.5b	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTGCAACCTGGAGGCTCCCTGAGGCTG TCCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGCTCCTACGATATGAGCTGGGTGAGGCAGGCT CCTGGAAAGGCCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCTCCGACGGAGGCGGCTACATCTACTAC	51

	TCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCCGGGACAACGCCAAGAACAACCTGTAC CTGCAGATGAACTCTCTCAGGGCTGAGGACACCGCGTGTATATCTGCGCCAGGGAGTTT GGCAAGAGGTACGCCCTGGATTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTGAGCTCC	
Hu1210 VH.5c	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTGCAACCTGGAGGCTCCCTGAGGCTG TCCTGTGCCGCTTCCGGCTTACCTTCAGCTCCTACGATATGAGCTGGGTGAGGCAGACC CCTGAGAAGAGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCTCCGACGGAGGCGGCTACATCTACTAC TCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCCGGGACAACGCCAAGAACAACCTGTAC CTGCAGATGAACTCTCTCAGGGCTGAGGACACCGCGTGTATATCTGCGCCAGGGAGTTT GGCAAGAGGTACGCCCTGGATTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTGAGCTCC	52
Hu1210_VH.5d	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTGCAACCTGGAGGCTCCCTGAGGCTG TCCTGTGCCGCTTCCGGCTTACCTTCAGCTCCTACGATATGAGCTGGGTGAGGCAGGCT CCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCTCCGACGGAGGCGGCTACATCTACTAC TCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCCGGGACAACGCCAAGAAGCTCCCTGTAC CTGCAGATGAACTCTCTCAGGGCTGAGGACACCGCGTGTATATCTGCGCCAGGGAGTTT GGCAAGAGGTACGCCCTGGATTACTGGGGCCAGGGCACACCTGGTGACAGTGAGCTCC	53
HL1210 VK	GACATCGTGATGACCCAGAGCCACAAGTTCATGAGCACCAGCGTGGGCGATAGGGTGAGC ATCAGCTGCAAGGCCAGCCAGGATGTGACCCCTGCCGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCC GGCCAGAGCCCCAAGCTGCTGATCTACAGCACCAGCAGCAGGTACACCGGCGTGCCCGAC AGGTTTACAGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTTCACCATCAGCAGCGTGACAGGCC GAGGACCTGGCCGTGTAATACTGTCAGCAGCAGTACACACCCCTCTGACCTTCGGCGCC GGCACCAAGCTGGAGCTGAAG	54
Hu1210 VK.1	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCTAGCGTGGGCGACAGGGTGACC ATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGATGTGACCCCTGCCGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCC GGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACAGCACCAGCAGCAGGTACACCGGCGTGCCCGAC AGGTTTACGGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCC GAGGACATCGCCACCTACTACTGTCAGCAGCAGTACACACCCCTCTGACCTTCGGCCAG GGCACCAAGCTGGAGATCAAG	55
Hu1210 VK.1a	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCTAGCGTGGGCGACAGGGTGACC ATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGATGTGACCCCTGCCGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCC GGCAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACAGCACCAGCAGCAGGTACACCGGCGTGCCCGAC AGGTTTACGGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCC GAGGACATCGCCACCTACTACTGTCAGCAGCAGTACACACCCCTCTGACCTTCGGCCAG GGCACCAAGCTGGAGATCAAG	56
Hu1210 VK.2	GACATTAGATGACCCAGTCCCTAGCAGCCTGTCCGCTTCCGTGGGCGACAGGGTGACC ATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGAGCTGACACCTGCTGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCT GGCAAGGCTCCTAAGCTCCTGATCTACAGCAGATCCTCCCGGTACACCGGAGTGCCCTCC AGGTTTACGGGAGCGGCTCCGGCACCGATTTACCCCTGACCATTTCTCCCTGCAGCCC GAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAGCAGCAGTACACACCCCTGACCTTCGGCCAG GGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGG	57
Hu1210 VK.2a	GACATTAGATGACCCAGTCCCTAGCAGCCTGTCCGCTTCCGTGGGCGACAGGGTGACC ATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGAGCTGACACCTGCTGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCT GGCAAGGCTCCTAAGCTCCTGATCTACAGCAGATCCTCCCGGTACACCGGAGTGCCCGAC AGGTTTACCGGAGCGGCTCCGGCACCGATTTACCCCTGACCATTTCTCCCTGCAGCCC GAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAGCAGCAGTACACACACCCCTGACCTTCGGCCAG GGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGG	58
Hu1210 VK.2b	GACATTAGATGACCCAGTCCCTAGCAGCCTGTCCGCTTCCGTGGGCGACAGGGTGACC ATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGAGCTGACACCTGCTGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCT GGCCAGAGCCCTAAGCTCCTGATCTACAGCAGATCCTCCCGGTACACCGGAGTGCCCGAC AGGTTTACCGGAGCGGCTCCGGCACCGATTTACCCCTGACCATTTCTCCCTGCAGCCC GAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAGCAGCAGTACACACACCCCTGACCTTCGGCCAG GGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGG	59
Hu1210 VK.2c	GACATTAGATGACCCAGTCCCTAGCAGCCTGTCCGCTTCCGTGGGCGACAGGGTGACC	60
	ATCAGCTGCAAGGCCAGCCAGGAGCTGACACCTGCTGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCT GGCCAGAGCCCTAAGCTCCTGATCTACAGCAGATCCTCCCGGTACACCGGAGTGCCCGAC AGGTTTACCGGAGCGGCTCCGGCACCGATTTACCCCTGACCATTTCTCCCTGCAGCCC GAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAGCAGCAGTACACACACCCCTGACCTTCGGCCAG GGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGG	

Гуманизированные гены VH и VK получали синтетическим путем, а затем, соответственно, клонировали в векторы, содержащие константные домены гамма 1 человека и каппа человека. При спаривании VH человека и VK человека получали 40 гуманизированных антител (см. табл. 9).

Таблица 9

Гуманизированные антитела с областями VH и VL

Vk	VH	Hu1210 VH.1	Hu1210 VH.1a	Hu1210 VH.1b	Hu1210 VH.2	Hu1210 VH.2a	Hu1210 VH.2.b	Hu1210 VH
Hu1210 Vk.1		Hu1210-1	Hu1210-2	Hu1210-3	Hu1210-4	Hu1210-5		
Hu1210 Vk.1a		Hu1210-7	Hu1210-8	Hu1210-9	Hu1210-10	Hu1210-11		
Hu1210 Vk								Химера Hu1210

Vk	VH	Hu1210 VH.3	Hu1210 VH.3a	Hu1210 VH.4	Hu1210 VH.4a	Hu1210 VH.4b
Hu1210 Vk.1		Hu1210-13	Hu1210-14	Hu1210-15	Hu1210-16	Hu1210-17
Hu1210 Vk.1a		Hu1210-18	Hu1210-19	Hu1210-20	Hu1210-21	Hu1210-22

Vk	VH	Hu1210 VH.5	Hu1210 VH.5a	Hu1210 VH.5b	Hu1210 VH.5c	Hu1210 VH.5d
Hu1210 Vk.2		Hu1210-23	Hu1210-27	Hu1210-31	Hu1210-32	Hu1210-36
Hu1210 Vk.2a		Hu1210-24	Hu1210-28		Hu1210-33	Hu1210-37
Hu1210 Vk.2b		Hu1210-25	Hu1210-29		Hu1210-34	Hu1210-38
Hu1210 Vk.2c		Hu1210-26	Hu1210-30		Hu1210-35	Hu1210-39

Vk	VH	Hu1210 VH.4c	Hu1210 VH.4d	Hu1210 VH.4e
Hu1210 Vk.1		Hu1210-40	Hu1210-41	Hu1210-42

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

Способность к связыванию рекомбинантного PD-L1 человека.

Для оценки антигенсвязывающей активности гуманизированных антител тестировали методом ИФА ELISA. Вкратце микротитрационные планшеты покрывали белком PD-L1-Fc человека в концентрации 0,1 мкг/мл в ФСБ, 100 мкл/лунку при 4°C в течение ночи, после чего блокировали 100 мкл/лунку 5% БСА. Пятикратные разведения гуманизированных антител, начиная с 10 мкг/мл, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1-2 ч при КТ. Планшеты промывали ФСБ/Tween, а затем инкубировали с антителом козы против IgG мыши, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 1 ч при КТ. После промывания планшеты проявляли с субстратом ТМВ и анализировали на спектрофотометре при OD 450-630 нм. Как показано на фиг. 6, все гуманизированные антитела демонстрируют сопоставимую эффективность связывания с PD-L1 человека по сравнению с химерным антителом.

Способность к связыванию с экспрессируемым у млекопитающих PD-L1 человека.

Для оценки антигенсвязывающей способности анализировали связывание гуманизированных антител с экспрессируемым у млекопитающих PD-L1 с применением FACS. Вкратце сначала клетки PDL1-CHOK1 инкубировали с 5-кратными серийными разведениями гуманизированных антител, начиная с 2 мкг/мл, при КТ в течение 1 ч. После промывания буфером для FACS (ФСБ с 2% ФБС) добавляли в каждую лунку конъюгированное с Alexa 488 антитело против IgG человека и инкубировали при КТ в течение 1 ч. MFI Alexa 488 оценивали с использованием FACSAriaIII. Как показано на фиг. 7, все гуманизированные антитела могут высокоэффективно связываться с PD-L1, экспрессируемым на клетках млекопитающих, сопоставимым с химерным антителом образом.

Для изучения кинетики связывания гуманизированного антитела в указанном примере проводили ранжирование по аффинности с применением Octet Red 96. Как показано в табл. 10, Hu1210-3, Hu1210-8, Hu1210-9, Hu1210-14, Hu1210-17, Hu1210-1 и Hu1210-22 демонстрируют наилучшую аффинность, сопоставимую с химерным антителом.

Таблица 10

Ранжирование по аффинности гуманизированных антител

Антитело	KD (M)	$k_{on}(1/Mc)$	$k_{dis}(1/c)$	Антитело	KD (M)	$k_{on}(1/Mc)$	$k_{dis}(1/c)$
Hu1210	7,16E-09	3,94E+05	2,83E-03	Hu1210-11	4,18E-09	7,54E+04	3,15E-04
(mIgG)							
H1210 химера	1,07E-09	1,62E+05	1,73E-04	Hu1210-13	4,36E-09	8,38E+04	3,66E-04
Hu1210-1	4,25E-09	7,10E+04	3,02E-04	Hu1210-14	2,34E-09	8,41E+04	1,97E-04
Hu1210-2	3,23E-09	7,78E+04	2,51E-04	Hu1210-15	4,45E-09	7,87E+04	3,50E-04
Hu1210-3	2,64E-09	8,62E+04	2,28E-04	Hu1210-16	3,14E-09	8,41E+04	2,64E-04
Hu1210-4	7,68E-09	7,12E+04	5,46E-04	Hu1210-17	2,20E-09	8,17E+04	1,80E-04
Hu1210-5	4,83E-09	7,93E+04	3,83E-04	Hu1210-18	4,50E-09	7,92E+04	3,57E-04
Hu1210-7	4,78E-09	8,45E+04	4,04E-04	Hu1210-19	2,50E-09	9,03E+04	2,25E-04
Hu1210-8	1,64E-09	7,72E+04	1,27E-04	Hu1210-20	4,51E-09	8,87E+04	4,00E-04
Hu1210-9	2,33E-09	8,37E+04	1,95E-04	Hu1210-21	3,12E-09	9,39E+04	2,93E-04
Hu1210-10	7,03E-09	8,59E+04	6,04E-04	Hu1210-22	2,56E-09	9,00E+04	2,30E-04

Определение полной кинетической аффинности гуманизированных антител с применением Bicasore®.

Связывание гуманизированных антител с рекомбинантным белком PD-L1 (PD-L1 человека с his-меткой) тестировали с применением способа захвата в системе Bicasore™. mAb мыши HL1210-3 захватывали с применением антитела против Fc мыши, нанесенного на CM5-чип. Серийные разведения белка PD-L1 человека с his-меткой вводили поверх захваченного антитела в течение 3 мин при скорости потока 25 мкг/мл. Антигену позволяли диссоциировать в течение 900 с. Эксперимент полностью проводили на Bicasore T200. Анализ данных проводили с использованием аналитического программного обеспечения Bicasore T200; результаты представлены в табл. 11 ниже.

Таблица 11

Определение аффинности с применением Bicasore

Антитело	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	KD (M)
Hu1210-8	9,346E+4	7,169E-5	7,671E-10
Hu1210-9	9,856E+4	4,528E-5	4,594E-10
Hu1210-14	1,216E+5	5,293E-5	4,352E-10
Hu1210-16	9,978E+4	6,704E-5	6,720E-10
Hu1210-17	1,101E+5	2,128E-5	1,933E-10
Hu1210-28	1,289E+5	1,080E-4	8,378E-10
Hu1210-31	1,486E+5	1,168E-4	7,862E-10
Hu1210-36	1,461E+5	7,852E-5	5,376E-10
Hu1210-40	8,77E+04	1,31E-04	1,49E-09
Hu1210-41	9,17E+04	3,46E-05	3,78E-10
Hu1210-42	8,68E+04	7,53E-05	8,67E-10
Химера 1210	1,236E+5	3,265E-5	2,642E-10

Межвидовая активность.

Для оценки связывания гуманизированных антител с huPD-L1, PD-L1 мыши, PD-L1 крысы, PD-L1 макака-резус проводили тестирование антител методом ИФА ELISA. Вкратце микротитрационные планшеты покрывали белком PD-L1-Fc человека, мыши, крысы и макака-резуса в концентрации 1 мкг/мл в ФСБ, 100 мкл/лунку при 4°C в течение ночи, после чего блокировали 100 мкл/лунку 5% БСА. Трехкратные разведения гуманизированных антител, начиная с 1 мкг/мл, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1-2 ч при КТ. Планшеты промывали ФСБ/Tween, а затем инкубировали с антителом козы против IgG мыши, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 1 ч при КТ. После промывания планшеты проявляли с субстратом TMB и анализировали на спектрофотометре при OD 450-630 нм.

Антитело Hu1210-41 может связываться с PD-L1 макака-резуса с меньшей аффинностью и не способно связываться с PD-L1 крысы и мыши (фиг. 8).

	Человек	Макак-резус	Крыса	Мышь
EC50	0,215 нМ	0,628 нМ	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует

Специфичность в отношении представителей семейства.

Для оценки связывания гуманизированного антитела против PD-L1 с семейством B7 человека и другими контрольными точками иммунного ответа исследовали связывание указанного антитела с B7-H1 (PD-L1), B7-DC, B7-1, B7-2, B7-H2, PD-1, CD28, CTLA4, ICOS и BTLA с применением ИФА ELISA. Как показано на фиг. 9, антитело Hu1210-41 способно специфически связываться только с B7-H1 (PD-L1).

Пример 8. Гуманизированные антитела блокировали активность PD-L1 человека в отношении PD-1. Клеточный анализ блокирования рецепторов.

Для оценки блокирующего эффекта гуманизированных антител на связывание PD-L1 человека, экспрессируемого на клетках млекопитающих, с его рецептором PD-1 использовали анализ блокирования рецепторов на основе метода FACS. Вкратце клетки PDL1-CHOK1 сначала инкубировали с 3-кратными серийными разведениями mAb мыши HL1210-3, начиная с 20 мкг/мл, при КТ в течение 1 ч. После промывания буфером для FACS (ФСБ с 2% ФБС) добавляли в каждую лунку меченые биотином huPD-1 и инкубировали при КТ в течение 1 ч. После этого добавляли в каждую лунку стрептавидин-ФЭ на 0,5 ч после двукратного промывания буфером для FACS. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) ФЭ оценивали с использованием FACSAriaIII.

$$\% \text{ ингибирования} = \left(1 - \frac{\text{MFI тестируемого антитела}}{\text{MFI контроля-основы}} \right) \times 100\%$$

Как показано в табл. 12 ниже, антитела Hu1210-3, Hu1210-9, Hu1210-8, Hu1210-14, Hu1210-17, Hu1210-19 и Hu1210-22 демонстрируют сопоставимую с химерным антителом эффективность в отношении блокирования связывания PD-L1 с PD-1.

Таблица 12
Анализ блокирования рецепторов PD-1

	Bio-PD1 (30 мкг/мл)	
	TOP	EC50
Химера H1210	87,16	3,961
Hu1210-8	86,35	4,194
Hu1210-9	85,7	4,038
Hu1210-16	88,02	5,436
Hu1210-17	80,88	4,424
Hu1210-3	84,28	3,693
Hu1210-14	79,56	3,572
Hu1210-19	87,45	4,52
Hu1210-22	85,83	4,505
Hu1210-27	103,9	11,48
Hu1210-31	92,91	6,179
Hu1210-36	91,75	8,175

Анализ блокирования рецепторов при применении рекомбинантного PD-L1 человека.

Существует два рецептора PD-L1 человека, а именно PD-1 и B7-1. Для изучения блокирующих свойств гуманизированного антитела к PD-L1 на указанные два белка в настоящей работе использовали белковый анализ блокирования рецепторов. Вкратце микротитрационные планшеты покрывали белком человека PD-L1-Fc в концентрации 1 мкг/мл в ФСБ, внося по 100 мкл/лунку, при 4°C в течение ночи, после чего блокировали 200 мкл/лунку 5% БСА при 37°C в течение 2 ч. 50 мкл меченого биотином белка человека PD-1-Fc или B7-1v и по 50 мкл 5-кратных разведений антител к PD-L1, начиная с 100 нМ, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Планшеты промывали ФСБ/Tween, а затем инкубировали со стрептавидином-HRP в течение 1 часа при 37°C. После промывания планшеты проявляли с субстратом ТМВ и анализировали на спектрофотометре при OD 450 нм. Как показано на фиг. 10 и 11, Hu1210-41 может эффективно ингибировать связывание PD-L1 человека с PD1 человека и B7-1.

Пример 9. Стимулированный гуманизированным антителом иммунный ответ Т-клеток человека.

Анализ с использованием реакции смешанной культуры лимфоцитов.

Для оценки функции гуманизированных антител *in vitro* оценивали ответ Т-клеток человека в условиях реакции смешанной культуры лимфоцитов. Проводили дифференцировку ДК человека из CD14+ моноцитов в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4 на протяжении 7 дней. Затем CD4+ Т-клетки, выделенные от другого донора, культивировали совместно с ДК и серийными разведениями блокирующего антитела против PD-L1. На 5 день после инокуляции анализировали продуцирование ИЛ-2 и ИФН-γ в культуральном супернатанте. Результаты показали, что антитела Hu1210-8, Hu1210-9, Hu1210-16 и Hu1210-17 могут дозозависимым образом стимулировать продуцирование ИЛ-2 и ИФН-γ, что указывает на способность антител против PD-L1 стимулировать ответ Т-клеток человека.

Анализ с панелью антигенов CMV.

Для оценки функции гуманизированных антител *in vitro* оценивали ответ Т-клеток человека в анализе с панелью антигенов CMV. МКИП человека стимулировали 1 мкг/мл антигена CMV в присутствии серийных разведений гуманизированных антител. Как показано на фиг. 12 и 13, Hu1210-40, Hu1210-41 и Hu1210-17 могут дозозависимым образом стимулировать продуцирование ИФН-γ.

Пример 10. Ингибирование роста опухоли под действием mAb против PD-L1.

Клетки линии аденокарциномы легкого человека HCC827 прививают мышам NOD Scid Gamma (NSG). Мыши NSG представляют собой иммунодефицитных мышей NOD Scid Gamma с наиболее выра-

женным иммунодефицитом, что делает их идеальными реципиентами опухолевых клеток человека и прививки МКПК. Через 10 дней после прививки мышам-носителям опухолей трансплантируют МКПК человека. Приблизительно через 20 дней после прививки, когда объем опухоли достигает 100-150 мм³, мышам начинают вводить антитело PD-L1 через день в дозировке 5 мг/кг. Объем опухоли отслеживают через день при введении антитела. Как показано на фиг. 14, Hu1210-31 может ингибировать рост опухоли на 30% в дозировке 5 мг/кг. Антитело Hu1210-41 может дозозависимым образом ингибировать рост опухоли, при этом антитело Hu1210-41 также дозозависимым образом снижает массу опухоли (фиг. 15).

Пример 11. Компьютерное моделирование дополнительных вариантов и оптимизации гуманизованных антител.

Предусматривалось, что определенные остатки аминокислот в пределах CDR областей или каркасных областей могут быть изменены для дополнительного улучшения или сохранения активности и/или стабильности антител. Используя вычислительный инструмент (VectorNTI, доступен по ссылке www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalo/) тестировали структурные, конформационные и функциональные свойства вариантов; обнаруженные перспективные варианты (в пределах областей CDR) перечислены в таблицах ниже.

Таблица 13

Области CDR VH и VL и их варианты, подходящие для включения в гуманизованные антитела

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH CDR1	<u>S</u> YDMS	1
	T <u>Y</u> DMS	61
	C <u>Y</u> DMS	62
	S <u>F</u> DMS	63
	S <u>H</u> DMS	64
	S <u>W</u> DMS	65
	SYD <u>M</u> T	66
	SYD <u>M</u> C	67

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH CDR2	TISDGGG <u>Y</u> IYYSDSVKG	2
	TISDGGG <u>A</u> IYYSDSVKG	68
	TISDGGG <u>P</u> IYYSDSVKG	69
	TISDGGG <u>F</u> IYYSDSVKG	70
	TISDGGG <u>H</u> IYYSDSVKG	71
	TISDGGG <u>W</u> IYYSDSVKG	72
	TISDGGG <u>Y</u> IYYSD <u>T</u> VKG	73
	TISDGGG <u>Y</u> IYYSD <u>C</u> VKG	74
	TISDGGG <u>Y</u> IYYSD <u>S</u> LKG	75
	TISDGGG <u>Y</u> IYYSD <u>S</u> IKG	76
	TISDGGG <u>Y</u> IYYSD <u>S</u> MKG	77

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH CDR3	<u>E</u> FGKRYALDY	3
	QFGKRYALDY	78
	<u>D</u> FGKRYALDY	79
	<u>N</u> FGKRYALDY	80
	E <u>Y</u> GKRYALDY	81
	E <u>H</u> GKRYALDY	82
	E <u>W</u> GKRYALDY	83
	E <u>F</u> A <u>K</u> RYALDY	84
	E <u>F</u> <u>P</u> KRYALDY	85
	E <u>F</u> G <u>R</u> RYALDY	86
	EFGK <u>K</u> RYALDY	87
	EFGK <u>R</u> FALDY	88
	EFGK <u>R</u> HALDY	89
	EFGK <u>R</u> WALDY	90

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
----------	--------------------	------------

VL CDR1	KASQDVTPAVA	4
	KATQDVTPAVA	91
	KACQDVTPAVA	92

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VL CDR2	STSSRYT	5
	TTSSRYT	93
	CTSSRYT	94
	SSSSRYT	95
	SMSSRYT	96
	SVSSRYT	97
	STTSRYT	98
	STCSRYT	99
	STSTRYT	100
	STSCRYT	101
	STSSKYT	102
	STSSRET	103
	STSSRHT	104
	STSSRWT	105

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VL CDR3	QQHYTTPLT	6
	EQHYTTPLT	106
	DQHYTTPLT	107
	NQHYTTPLT	108
	QEHYTTPLT	109
	QDHYTTPLT	110
	QNHYTTPLT	111

Подчеркиванием выделены горячие точки для мутированных остатков и соответствующие замены.

Пример 12. Идентификация эпитопа PD-L1.

Указанное исследование проводили для идентификации остатков аминокислот, вовлеченных в связывание PD-L1 с антителами согласно настоящему описанию.

Конструировали библиотеку PD-L1 с применением сканирования аланином. Вкратце получали 217 мутантных клонов PD-L1 на платформе для конструирования белков от Integral Molecular. Определяли связывание Hu1210-41 Fab с каждым вариантом в библиотеке мутантов PD-L1 в двух повторностях с применением высокопроизводительной проточной цитометрии. Из каждой точки необработанных данных вычитали фоновую флуоресценцию и нормировали по реактивности в отношении PD-L1 дикого типа (WT). Для каждого варианта PD-L1 строили график средней величины связывания как функции от экспрессии (реактивность в отношении контрольного mAb против PD-L1). Для предварительной идентификации важнейших клонов (перечеркнутые кружки) использовали пороговые значения (пунктирные линии), соответствующие >70% связыванию WT с контрольным MAb и <30% реактивности WT с отношением Hu1210-41 Fab (фиг. 16). Y134, K162 и N183 из PDL1 были идентифицированы как необходимые для связывания Hu1210-41 остатки. Низкая реактивность клона N183A в отношении Hu1210-41 Fab предполагает, что он является основным энергетическим участником связывания Hu1210-41, и меньший вклад вносят Y134 и K162.

Важнейшие остатки (сферы) были идентифицированы в трехмерной структуре PD-L1 (PDB ID# 5JDR, Zhang et al., 2017), представленной на фиг. 17. Указанные остатки, Y134, K162 и N183, соответственно, составляют эпитоп PD-L1, отвечающий за связывание с антителами согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения.

Интересно отметить, что все указанные остатки, Y134, K162 и N183, локализованы в пределах IgC-домена белка PD-L1. Внеклеточные части как PD-1, так и PD-L1 содержат IgV-домен и IgC-домен. Общеизвестно, что PD-L1 связывается с PD-1 за счет связывания их IgV-доменов между собой. Однако Hu1210-41, в отличие от таких стандартных антител, связывается с IgC-доменом, что, как ожидалось, будет неэффективным для ингибирования связывания PD-1/PD-L1. Указанный другой эпитоп Hu1210-41, неожиданным образом, предположительно вносит вклад в выдающуюся активность Hu1210-41.

Пример 13. Конструирование антитела против PDL1.

В примерах 13-17 описана работа по идентификации дополнительно усовершенствованных антител на основе Hu1210-41 с применением мутагенеза.

Слитый белок индуцируемой активацией цитидиндезаминазы (AID) и не обладающего нуклеазной

активностью ассоциированного с разделенными регулярными промежутками кластерными короткими палиндромными повторами (CRISPR) белка 9 (dCas9) использовали для высокопроизводительного скрининга функциональных вариантов в Т-клетках 293. Вкратце одиночные гидовые (ог)РНК, распознающие 6 CDR антитела, может направлять слитый белок dCas9-AID к 6 CDR антитела и индуцируют мутации в области CDR. Мутированные антитела были экспонированы на поверхности клеток 293. Итоговые клетки продемонстрировали лучшую активность связывания, чем немутированный эквивалент; проводили их FACS-сортировку для последующего секвенирования. Была идентифицирована потенциально оказывающая положительный эффект на антитело мутация с заменой S60 на R в CDRH2.

Для оценки антигенсвязывающих свойств мутанта S60R (CDRH2) анализировали связывание указанных антител с экспрессируемым у млекопитающих PD-L1 с применением FACS. Вкратце клетки PD-L1 Raji сначала инкубировали с 5-кратными серийными разведениями гуманизированных антител, начиная с 2 мкг/мл, при КТ в течение 1 ч. После промывания буфером для FACS (ФСБ с 2% ФБС) добавляли в каждую лунку конъюгированное с Alexa 488 антитело против IgG человека и инкубировали при КТ в течение 1 ч. MFI для Alexa 488 оценивали с использованием FACS Aria III. Как показано на фиг. 18, мутант S60R высокоэффективно связывался с PD-L1, экспрессируемым на клетках млекопитающих, с большей активностью по сравнению с исходным антителом Hu1210-41. Затем указанный мутант S60R использовали в качестве исходного антитела для дальнейшего мутационного анализа согласно описанию ниже, и оно обозначено как "WT".

Для конструирования антител создавали четыре подбиблиотеки моноклональных антител против PD-L1 с применением любой из следующих стратегий. Согласно стратегии 1 проводили мутагенез вариабельного домена тяжелой цепи VH CDR3 или VL-CDR3 путем высокорандомизированных мутаций. Согласно стратегии 2 получали две комбинированных библиотеки CDR, состоящие из (VH-CDR3, VL-CDR3 и VL-CDR1) или (VH-CDR1, VH-CDR2 и VL-CDR2) с применением скрининга CDR методом "прогулки" с контролируемым уровнем мутаций.

Биопэннинг: способы фагового пэннинга адаптировали путем укорочения продолжительности инкубации/связывания до промывания в жестких условиях. Вкратце 100 мкл магнитных стрептавидиновых гранул (Invitrogen, США) блокировали 1 мл МФСБ в течение 1 ч при комнатной температуре. В другой пробирке фаговую библиотеку предварительно инкубировали ($5 \times 10^{11} \sim 12$ для каждого раунда) со 100 мкл магнитных стрептавидиновых гранул в 1 мл МФСБ для удаления нежелательных связывающих веществ. Магнитный концентратор частиц использовали для разделения фага и гранул. К фагу добавляли биотинилированный белок PD-L1, инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре и осторожно перемешивали с помощью шейкера с верхним приводом. Несущие фаг гранулы из раствора разделяли в магнитном концентраторе частиц; супернатант утилизировали. Гранулы промывали свежим промывочным буфером, 10-кратно промывали ФСБТ и 10-кратно - ФСБ (pH 7,4). Добавляли 0,8 мл 0,25% трипсина в ФСБ (Sigma, США) и инкубировали в течение 20 мин при 37°C для элюирования фага. Полученный фаг титровали и осуществляли "спасение" фага для следующего раунда пэннинга, со снижением концентрации антигена от раунда к раунду.

Скрининг методом ИФА ELISA и ранжирование скорости связывания/диссоциации Подбирали и индуцировали клоны из требуемых продуктов пэннинга; проводили ИФА ELISA фага для первичного скрининга; положительные клоны анализировали путем секвенирования; находили уникальные "горячие точки". В табл. 14 представлены идентифицированные мутации. Как показано ниже, остатки FGK в CDRH3 представляют собой остатки - "горячие точки", обеспечивающие получение усовершенствованных антител.

Таблица 14

Мутации в CDR

	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
WT*	SYDMS	TISDAGGYIYRDSVKG	EFGKRYALDY	KASQDVTPAVA	STSSRYT	QQHYTTPLT
SEQ ID NO:	1	116	3	4	5	6
B3	-----	-----	-----	--K-----	-----	M-----
C4	-----	-----	-----S	-----W----	-----	---S-----
B1	-----	-----	-ИФН-----	-----	-----	-----
B6	-----	-----	-LPW-----	-----	-----	-----
C3	-----	-----	-LHF-----	-----	-----	-----
C6	-----	-----	-LYF-----	-----	-----	-----
A1	-----	-----	-LLH-----	-----	-----	-----
A2	-----	-----	-LRG-----	-----	-----	-----
A3	-----	-----	-----	-----	-----	---SDA---

* WT отличается от Hu1210-41 заменой S60R (нумерация по Kabat) в тяжелой цепи для увеличения аффинности.

Последовательности аминокислот вариабельных областей указанных антител показаны в табл. 15 ниже.

Таблица 15

Последовательности антител		
Название	Последовательность	SEQ ID NO:
WT-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKSLLEWVAT ISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREF GKRYALDYWGQGTITVTVSS	141
WT-Vk	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCKASQDVTFAVAWYQQKPGKAPKLLIYS TSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQHYTTPITFGQ GTKLEIK	142
B3-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKSLLEWVAT ISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREF GKRYALDYWGQGTITVTVSS	143
B3-Vk	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCKAQDVTFAVAWYQQKPGKAPKLLIYS TSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCMQHYTTPITFGQ GTKLEIK	144
C4-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKSLLEWVAT ISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREF GKRYALDSWGQGTITVTVSS	145
C4-Vk	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCKASQDVWPAVAWYQQKPGKAPKLLIYS TSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQGHSTTPITFGQ GTKLEIK	146
	GTKLEIK	
B1-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKSLLEWVAT ISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREI FNRYALDYWGQGTITVTVSS	147
B1-Vk	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCKASQDVTFAVAWYQQKPGKAPKLLIYS TSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQHYTTPITFGQ GTKLEIK	148
B6-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKSLLEWVAT ISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREL PWRALDYWGQGTITVTVSS	149
B6-Vk	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCKASQDVTFAVAWYQQKPGKAPKLLIYS TSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQHYTTPITFGQ GTKLEIK	150
C3-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKSLLEWVAT ISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREL HFRYALDYWGQGTITVTVSS	151
C3-Vk	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCKASQDVTFAVAWYQQKPGKAPKLLIYS TSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQHYTTPITFGQ GTKLEIK	152
C6-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKSLLEWVAT ISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREL YFRYALDYWGQGTITVTVSS	153
C6-Vk	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCKASQDVTFAVAWYQQKPGKAPKLLIYS TSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQHYTTPITFGQ GTKLEIK	154
A1-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKSLLEWVAT ISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREL LHRYALDYWGQGTITVTVSS	155
A1-Vk	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCKASQDVTFAVAWYQQKPGKAPKLLIYS TSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQHYTTPITFGQ GTKLEIK	156
A2-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKSLLEWVAT ISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREL RGRYALDYWGQGTITVTVSS	157
A2-Vk	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCKASQDVTFAVAWYQQKPGKAPKLLIYS TSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQHYTTPITFGQ GTKLEIK	158
A3-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKSLLEWVAT ISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREF GKRYALDYWGQGTITVTVSS	159
A3-Vk	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCKASQDVTFAVAWYQQKPGKAPKLLIYS TSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQHS DAPITFGQ GTKLEIK	160

Пример 14. Антигенсвязывающие свойства антител к PD-L1.

Как показано в табл. 14 и 15, в общей сложности 9 уникальных клонов были охарактеризованы и преобразованы в полноразмерный IgG.

Способность к связыванию с рекомбинантным PD-L1 человека.

Для оценки антигенсвязывающей активности проводили тестирование антител методом ИФА ELISA. Вкратце микротитрационные планшеты покрывали PD-L1-Фс-белком человека в концентрации 2 мкг/мл в ФСБ, добавляя по 100 мкл/лунку, при 4°C в течение ночи, после чего блокировали добавлени-

ем 100 мкл/лунку 5% БСА. В каждую лунку добавляли 4-кратные разведения гуманизированных антител, начиная с 10 мкг/мл, и инкубировали в течение 1-2 ч при КТ. Планшеты промывали ФСБ/Tween, а затем инкубировали с антителом козы против IgG мыши, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 1 ч при КТ. После промывания планшеты проявляли с субстратом ТМВ и анализировали на спектрофотометре при OD 450-630 нм. Как показано на фиг. 19, все гуманизированные антитела продемонстрировали превосходную эффективность связывания с PD-L1 человека, причем B6 и C3 показали лучшие результаты по сравнению с исходным клоном дикого типа (WT).

Способность к связыванию с экспрессируемым у млекопитающих PD-L1 человека.

Для оценки антигенсвязывающей способности антител анализировали их связывание с экспрессируемым у млекопитающих PD-L1 с применением FACS. Вкратце клетки PDL1-Raji сначала инкубировали с 5-кратными серийными разведениями гуманизированных антител, начиная с 2 мкг/мл, при КТ в течение 1 ч. После промывания буфером для FACS (ФСБ с 2% ФБС) добавляли в каждую лунку конъюгированное с Alexa 488 антитело против IgG человека и инкубировали при КТ в течение 1 ч. MFI Alexa 488 оценивали с использованием FACS Aria III. Как показано на фиг. 20, B6 высокоэффективно связывался с PD-L1, экспрессируемым на клетках млекопитающих, с большей активностью по сравнению с исходным антителом дикого типа (WT).

Ранжирование гуманизированных антител по аффинности с применением Biacore.

Для изучения кинетики связывания гуманизированного антитела в указанном примере проводили ранжирование по аффинности с применением Biacore. Как показано в табл. 16, B6, C3, C6, A1 и A3 демонстрировали более высокую аффинность по сравнению с исходным антителом дикого типа (WT).

Таблица 16

Ранжирование по аффинности

Антитело	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)
WT	1,77E+05	4,64E-04	2,63E-09
B3	1,19E+05	2,96E-04	2,49E-09
C4	1,13E+05	5,06E-04	4,50E-09
B1	1,63E+05	2,61E-04	1,60E-09
B6	2,42E+05	2,46E-04	1,02E-09
C3	2,18E+05	2,99E-04	1,37E-09
C6	2,06E+05	3,34E-04	1,63E-09
A1	2,03E+05	2,76E-04	1,36E-09
A2	1,87E+05	4,75E-04	2,55E-09
A3	2,18E+05	3,24E-04	1,49E-09

Пример 15. Клеточная функция антител против PDL1.

Для тестирования способности антител против PDL1 стимулировать Т-клеточный ответ использовали экспрессирующие hPD-1 клетки Jurkat. Вкратце Jurkat представляет собой линию клеток Т-клеточного лейкоза человека, которые могут продуцировать ИЛ-2 при стимуляции TCR. В указанном анализе клетки Jurkat, трансфицированные геном PD-1 человека с использованием лентивируса, использовали в качестве клеток-респондеров. Клетки Raji-PDL1 использовали в качестве антигенпрезентирующих клеток (АПК). Энтеротоксины стафилококков (SE) используют для стимуляции сигнала TCR. В указанной системе эктопически экспрессируемый huPDL1 может подавлять стимулированное SE продуцирование ИЛ-2 клетками Jurkat, тогда как антитела против PDL1 могут предотвращать продуцирование ИЛ-2. Вкратце АПК ($2,5 \times 10^4$) культивировали совместно с экспрессирующими PD-1 Т-клетками Jurkat (1×10^5) при стимуляции SE. В начале культивирования добавляли антитела против PDL1 (начиная с 100 нМ, серийные разведения 1:4 для 8 доз). Через 48 ч оценивали продуцирование ИЛ-2 в культуральном супернатанте с применением ИФА ELISA. Как показано на фиг. 21, моноклональные антитела B6 обладали большей активностью по сравнению с исходным антителом дикого типа (WT).

Пример 16. Реакция смешанной культуры лимфоцитов.

Для оценки функции антител к PDL1 *in vitro* оценивали ответ Т-клеток человека в условиях реакции смешанной культуры лимфоцитов. Вкратце проводили дифференцировку ДК человека из CD14⁺ моноцитов в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4 на протяжении 7 дней. Затем CD4⁺ Т-клетки, выделенные от другого донора, культивировали совместно с ДК и серийными разведениями блокирующего антитела против PD-L1. На день 5 после инокуляции анализировали продуцирование ИФН- γ в культуральном супернатанте. Результаты (фиг. 22) показали, что антитело B6 более активно стимулировало продуцирование ИФН- γ по сравнению с исходным антителом дикого типа (WT).

Пример 17. *In vivo* эффективность антитела к PDL1 в сингенной модели MC38.

Для оценки эффекта PDL1 на рост опухоли использовали гуманизированную PDL1 сингенную модель опухоли MC38. В указанной модели ген PDL1 человека экспрессировали в клетках мыши MC38, при этом внеклеточный домен гена PDL1 мыши заменяли геном PDL1 человека. Соответственно в указанной сингенной модели с гуманизированным геном PDL1 MC38 можно оценить эффективность действия антитела против PDL1 человека на рост опухоли. Клетки huPDL1 MC38 инокулировали подкожно

гуманизированным PDL1 мышам. После достижения опухолью объема 100-150 м³ внутрибрюшинно вводили в дозировке 3 мг/кг два раза в неделю в общей сложности 6 доз исходного антитела WT и антител B6. Результат (фиг. 23) показал, что антитело B6 было более активным по сравнению с исходным антителом WT с 19 по 26 день.

* * *

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными описанными вариантами реализации, которые приведены в качестве отдельных иллюстративных примеров индивидуальных аспектов настоящего изобретения, и любые функционально эквивалентные им композиции или способы входят в объем настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники будет понятно, что могут быть реализованы различные модификации и варианты способов и композиций согласно настоящему описанию без отступления от существа или объема настоящего изобретения. Соответственно предполагается, что настоящим описанием охвачены модификации и варианты настоящего изобретения при условии того, что они входят в объем прилагаемой формулы изобретения, а также их эквиваленты.

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его фрагмент, причем указанное антитело или его фрагмент обладает специфичностью в отношении белка PD-L1 человека и содержит вариательную область тяжелой цепи (VH) и вариательную область легкой цепи (VL), где

VH содержит

- (a) VH CDR1, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1;
- (b) VH CDR2, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 116; и
- (c) VH CDR3, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 117; и

VL содержит

- (d) VL CDR1, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 4;
- (e) VL CDR2, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5; и
- (f) VL CDR3, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6; или

VH содержит

- (g) VH CDR1, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1;
- (h) VH CDR2, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 116; и
- (i) VH CDR3, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 3; и

VL содержит

- (j) VL CDR1, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 4;
- (k) VL CDR2, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5; и
- (l) VL CDR3, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6 или 140.

2. Антитело или его фрагмент по п.1, где указанная VH CDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1, указанная VH CDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 116, указанная VH CDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 117, указанная VL CDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 4, указанная VL CDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5, а указанная VL CDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6.

3. Антитело или его фрагмент по п.2, где VH содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 149, и VL содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 150.

4. Антитело или его фрагмент по п.1, где указанная VH CDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1, указанная VH CDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 116, указанная VH CDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 3, указанная VL CDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 4, указанная VL CDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5, а указанная VL CDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 140.

5. Антитело или его фрагмент по п.4, где VH содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 159, и VL содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 160.

6. Антитело или его фрагмент по п.1, где указанная VH CDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1, указанная VH CDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 116, указанная VH CDR3 содержит последовательность аминокислот,

представленную в SEQ ID NO: 3, указанная VL CDR1 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 4, указанная VL CDR2 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5, а указанная VL CDR3 содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6.

7. Антитело или его фрагмент по п.6, где VH содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 141, и VL содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 142.

8. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-7, дополнительно содержащие константную область тяжелой цепи, константную область легкой цепи, Fc-область или комбинацию перечисленного.

9. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-8, где указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело.

10. Биспецифическое антитело, содержащее фрагмент по любому из пп.1-9 и второй антигенсвязывающий фрагмент, обладающий специфичностью в отношении молекулярной структуры на иммунной клетке.

11. Биспецифическое антитело по п.10, отличающееся тем, что указанная молекула выбрана из группы, состоящей из PD-1, CTLA-4, LAG-3, CD28, CD122, 4-1BB, TIM3, OX-40, OX40L, CD40, CD40L, LIGHT, ICOS, ICOSL, GITR, GITRL, TIGIT, CD27, VISTA, B7H3, B7H4, HEVM, BTLA, KIR и CD47.

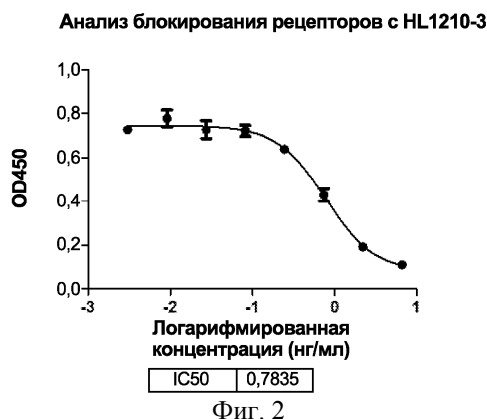
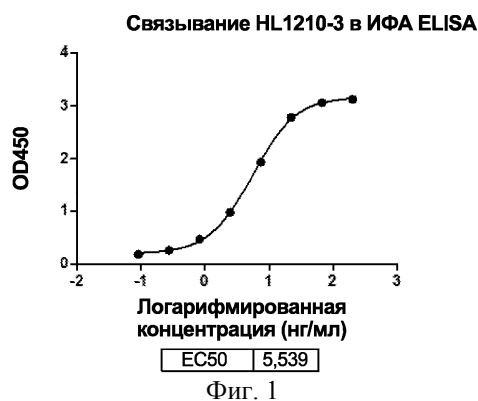
12. Фармацевтическая композиция для лечения рака или инфекции, содержащая антитело или его фрагмент по любому из пп.1-10 и фармацевтически приемлемый носитель.

13. Выделенная клетка для лечения рака или инфекции, содержащая один или более полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент по любому из пп.1-10.

14. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп.1-10 для лечения рака или инфекции.

15. Применение по п.14, отличающееся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака печени, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака эндометрия, лейкоза, лимфомы, рака поджелудочной железы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака уретры, рака головы и шеи, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака пищевода, рака яичников, рака почек, меланомы, рака предстательной железы и рака щитовидной железы.

16. Применение по п.14, отличающееся тем, что указанная инфекция представляет собой вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию или паразитарную инфекцию.

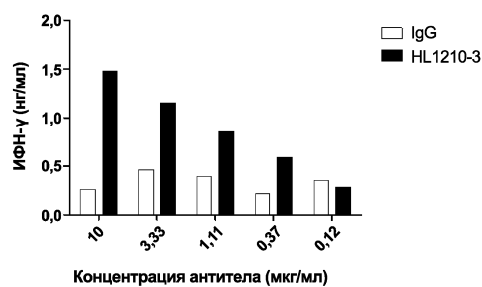




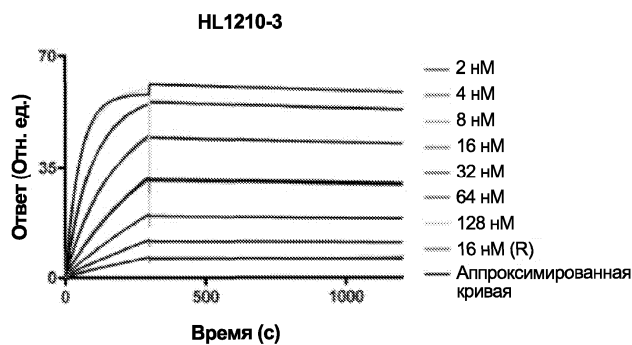
IC50	2,563e-009
------	------------

Фиг. 3

Анализ с использованием реакции смешанной культуры лимфоцитов

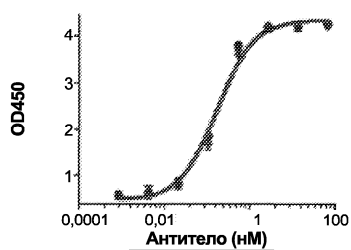


Фиг. 4



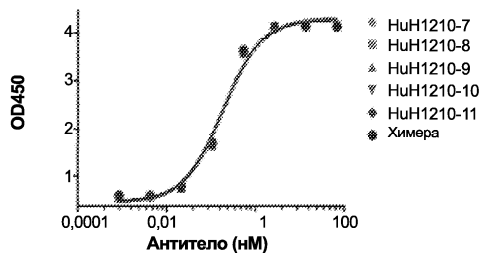
Фиг. 5

А Связывание с покрытием hPD-L1 в ИФА ELISA с АТ человека



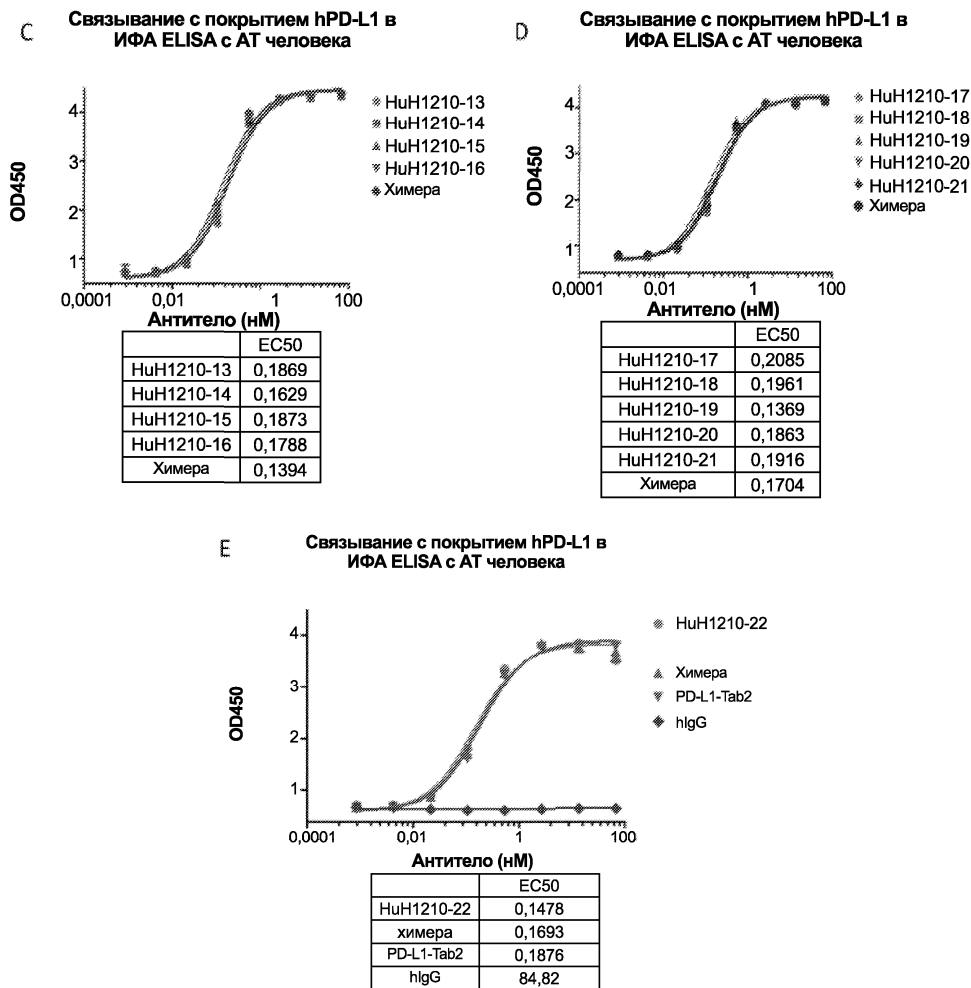
	EC50
HuH1210-1	0,1674
HuH1210-2	0,1682
HuH1210-3	0,1856
HuH1210-4	0,1842
HuH1210-5	0,1928
Химера	0,1803

В Связывание с покрытием hPD-L1 в ИФА ELISA с АТ человека

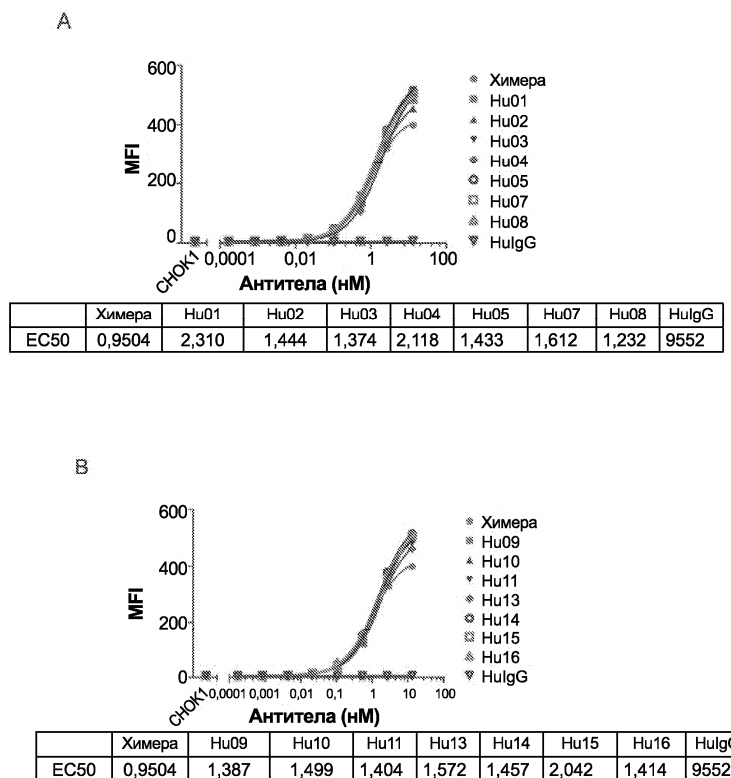


	EC50
HuH1210-7	0,1846
HuH1210-8	0,1865
HuH1210-9	0,1835
HuH1210-10	0,1904
HuH1210-11	0,1764
Химера	0,1771

Фиг. 6

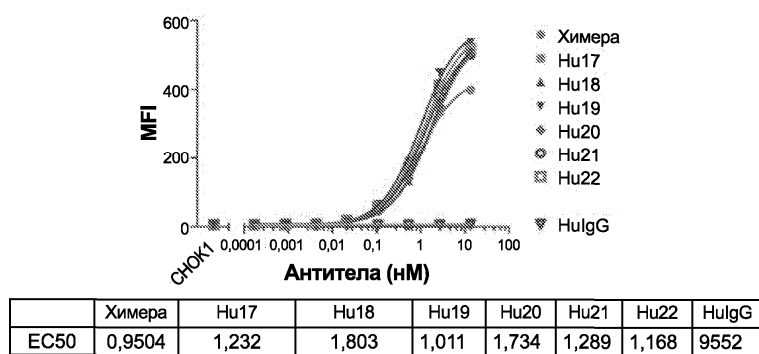


Фиг. 6 (продолжение)

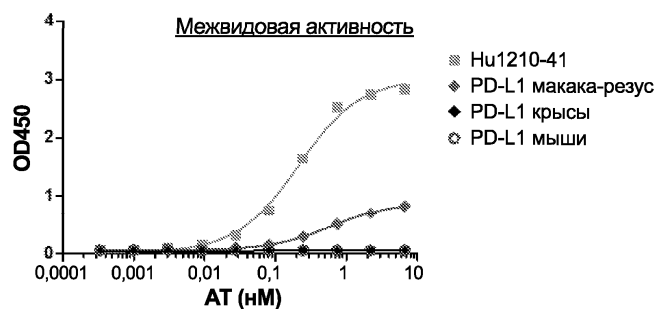


Фиг. 7

C



Фиг. 7 (продолжение)

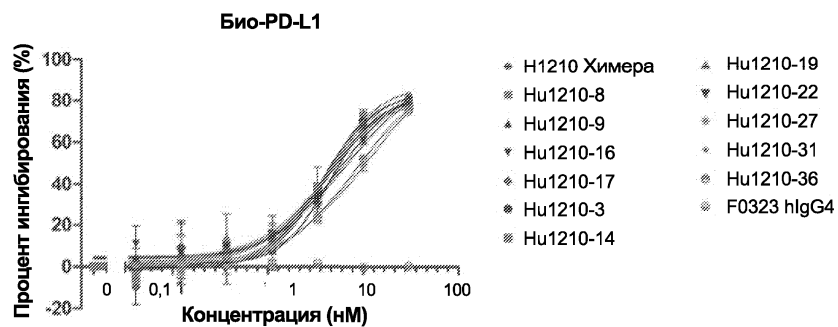


Фиг. 8



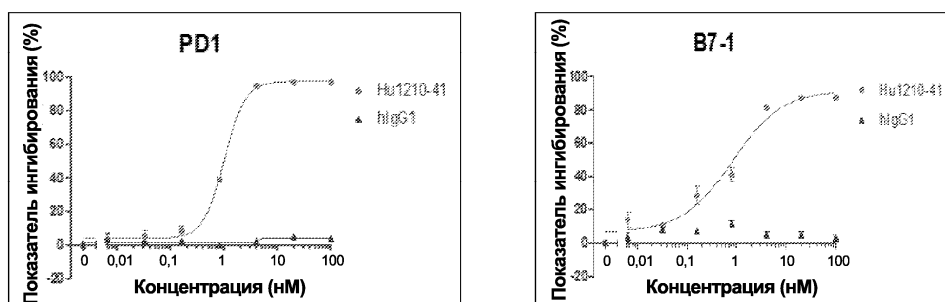
Фиг. 9

Клеточный анализ блокады рецепторов



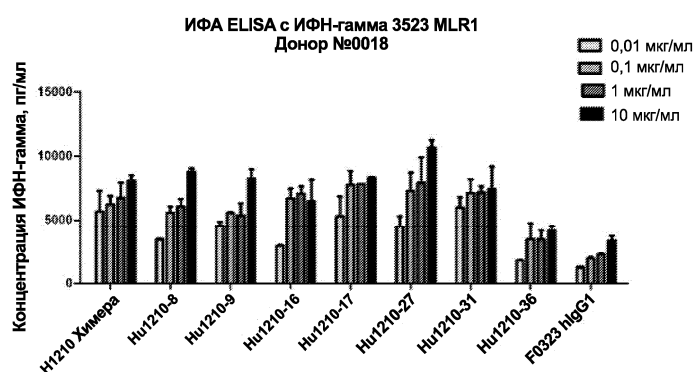
Фиг. 10

Клеточный анализ блокады рецепторов

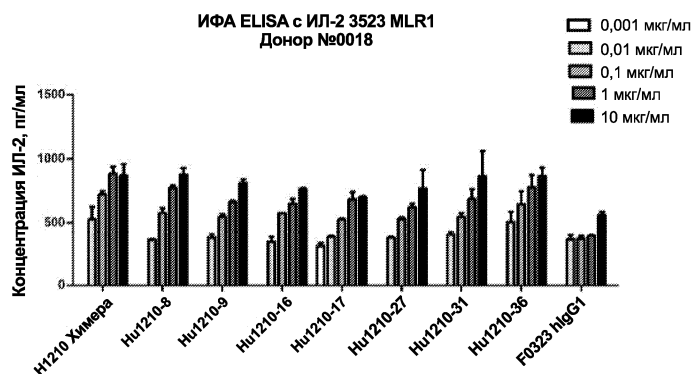


Фиг. 11

Анализ в реакции смешанной культуры лимфоцитов

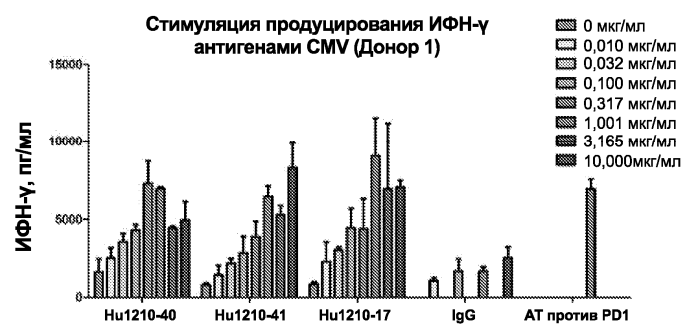


Анализ в реакции смешанной культуры лимфоцитов

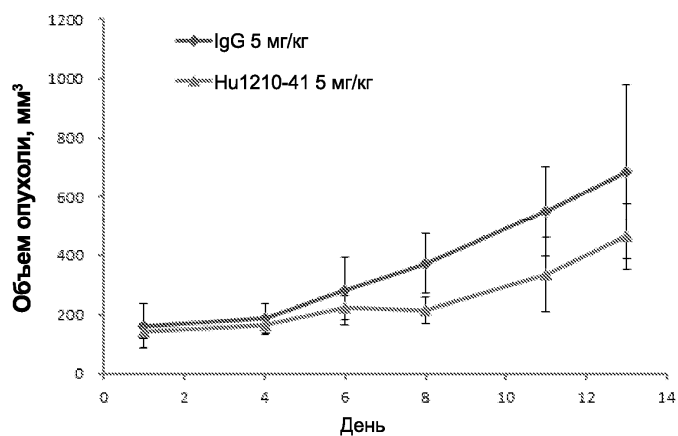


Фиг. 12

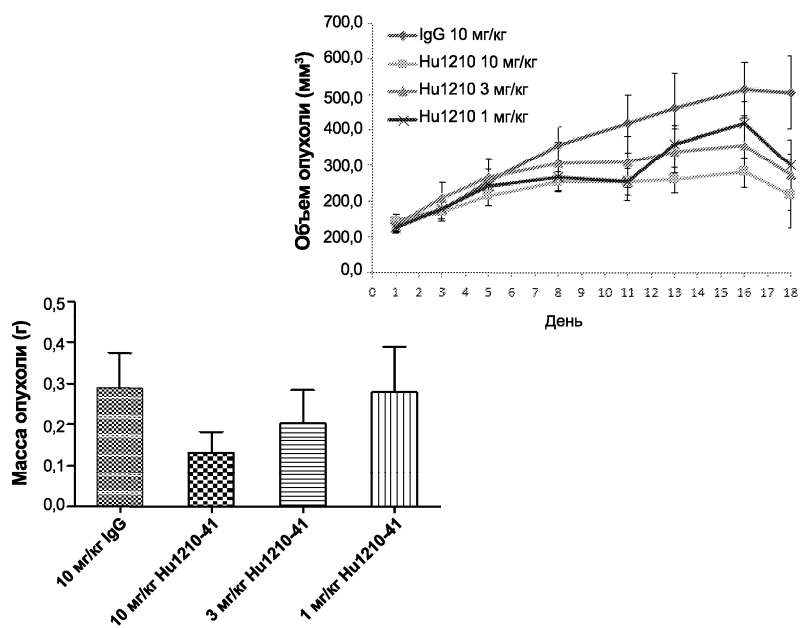
Анализ с панелью антигенов CMV



Фиг. 13



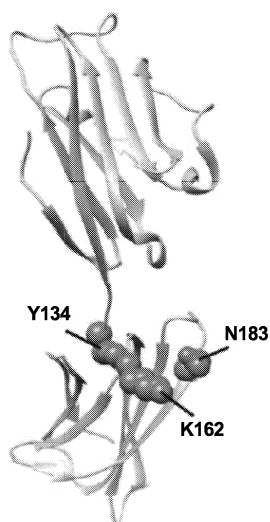
Фиг. 14



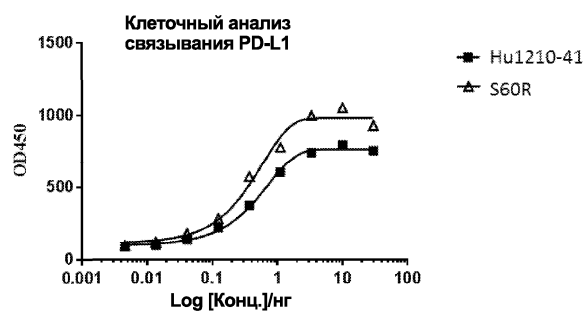
Фиг. 15



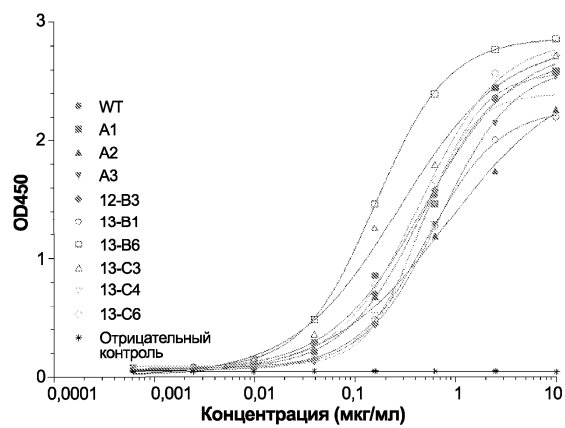
Фиг. 16



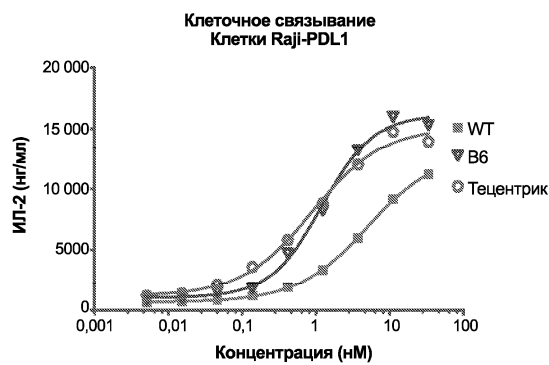
Фиг. 17



Фиг. 18



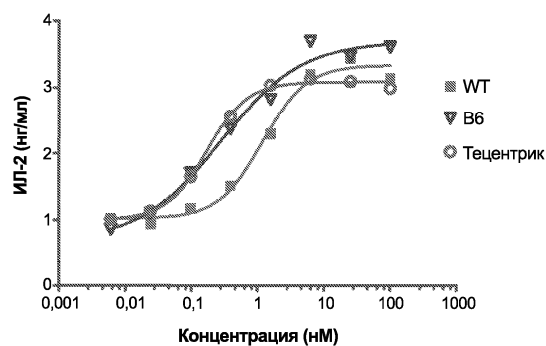
Фиг. 19



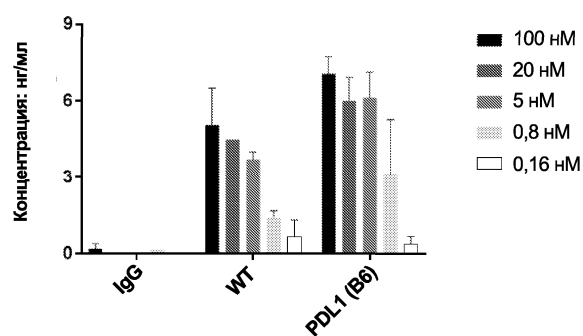
	WT	B6	Тецентрик
EC50	5,043	1,204	0,8905

Фиг. 20

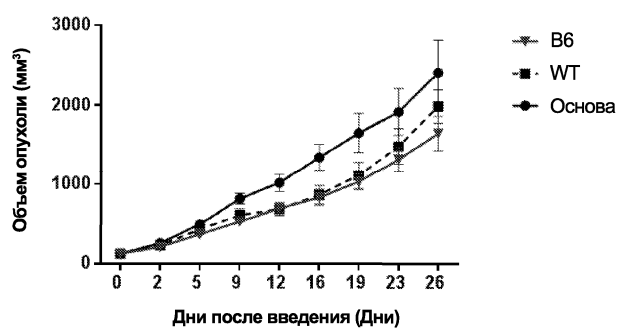
Клеточный анализ на клетках Jurkat-PD-1



Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23

