

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044327**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.08.16

(21) Номер заявки
201900443

(22) Дата подачи заявки
2018.04.18

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛО К PD-L1 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **US2017/028206**

(32) **2017.04.18**

(33) **US**

(43) **2020.03.06**

(86) **PCT/US2018/028206**

(87) **WO 2018/195226 2018.10.25**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
P-ФАРМ ОВЕРСИЗ ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Лавровский Ян, Ксу Тинг, Барбашов
Сергей (US), Репик Алексей,
Самсонов Михаил, Игнатъев Василий,
Арчуадзе Шорена (RU)**

(74) Представитель:
Попова А.О. (RU)

(56) **WO-A2-2016149201
US-A1-20160272712
WO-A1-2015103602**

(57) Раскрыты полностью человеческие антитела к PD-L1 и их соответствующие области применения. Полностью человеческие антитела способны к специфичному связыванию человеческого PD-L1. Антитела были получены путем применения метода скрининга на основе библиотеки дрожжевого дисплея, а также путем созревания аффинности для дополнительного улучшения их аффинности к PD-L1. Раскрыты полностью человеческие антитела к PD-L1 проявляют надлежащую специфичность, аффинность и стабильность. Они способны усиливать активность Т-лимфоцитов посредством связывания с активированными Т-лимфоцитами, при этом значительно ингибируя рост опухоли. Раскрыты полностью человеческие антитела к PD-L1 можно применять в диагностике и лечении PD-L1-связанных злокачественных новообразований и других сопутствующих заболеваний.

B1

044327

044327

B1

Изобретение принадлежит к области биомедицины и относится к полностью человеческим антителам к PD-L1 и вариантам их фармацевтического применения.

Общие сведения

Антигенпрезентирующие клетки (АПК) необходимы Т-лимфоцитам для передачи покоящимся Т-лимфоцитам в ответ на экзогенный антиген двух видов сигналов: первого сигнала, генерируемого Т-лимфоцитами при распознавании антигенных пептидов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) при помощи Т-клеточного рецептора (TCR), в результате которого сигнал распознавания антигена передается посредством комплекса TCR/CD3; и второго сигнала, образуемого серией костимулирующих молекул; в результате этих событий происходит нормальная активация Т-лимфоцитов, обеспечивающая, в свою очередь, нормальный иммунный ответ. В зависимости от действий, производимых вторым сигналом, эти костимулирующие молекулы можно классифицировать как положительные костимулирующие молекулы и отрицательные костимулирующие молекулы, и регуляция положительных и отрицательных костимулирующих сигналов, а также относительный баланс между этими сигналами играют важную регуляторную роль в иммунном ответе всего организма.

Белок программируемой клеточной смерти (PD-1) является представителем семейства рецепторов CD28, которое также включает в себя антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA4), кластер дифференцировки 28 (CD28), индуцибельный костимулятор (ICOS) и В- и Т-лимфоцитарный аттенуатор (BTLA). Начальные представители этого семейства CD28 и ICOS были открыты, когда при добавлении моноклональных антител наблюдали, что они приводят к увеличению пролиферации Т-лимфоцитов (Hutloff et al. (1999) *Nature* 397: 263-266; Hansen et al. (1980) *Immunogenetics* 10: 247-260). Лиганды белка PD-1 включают PD-L1 и PD-L2, и по результатам исследований уже показано, что связывание рецептора с лигандом приводит к понижающей регуляции Т-клеточной активации и секреции соответствующих цитокинов (Freeman et al. (2000) *J Exp Med* 192: 1027-34; Latchman et al. (2001) *Nat Immunol* 2: 261-8; Carter et al. (2002) *Eur J Immunol* 32: 634-43; Ohigashi et al. (2005) *Clin Cancer Res* 11: 2947-53). PD-L1 (B7-H1) представляет собой гликопротеин клеточной поверхности, принадлежащий к семейству B7, и включает в себя IgV- и IgC-подобные области, трансмембранную область и внутриклеточный концевой сегмент. Соответствующий ген был впервые открыт и клонирован в 1999 г. (Dong H et al. (1999) *Nat Med* 5: 1365-1369), а сам гликопротеин, как было установлено, взаимодействует с Т-клеточным рецептором PD-1 и играет важную роль в отрицательной регуляции иммунного ответа. Кроме действий на PD-1, экспрессирующийся на Т-лимфоцитах, PD-L1 в результате его экспрессии на Т-лимфоцитах может взаимодействовать с CD80 на АПК, передавая сигналы отрицательной регуляции, то есть функционировать в качестве ингибитора Т-лимфоцитов. Помимо его экспрессии в линии макрофагов, PD-L1 также экспрессируется на низких уровнях в нормальных тканях человека, но относительно высокая экспрессия этого гликопротеина показана в некоторых линиях опухолевых клеток, включающих, например, линии клеток рака легкого, рака яичника, рака ободочной кишки и меланому (Iwai et al. (2002) *PNAS* 99: 12293-7; Ohigashi et al. (2005) *Clin Cancer Res* 11: 2947-53). По результатам исследований предположили, что повышенная экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках усиливает апоптоз Т-лимфоцитов и за счет этого играет важную роль в механизме, позволяющем избежать опухолевым клеткам иммунного ответа. Исследователями было обнаружено, что трансфицированные геном PD-L1 линии опухолевых клеток P815 могут проявлять резистентность *in vitro* к специфичному лизису цитолитическими Т-лимфоцитами, и при инокуляции этих клеток мышам их туморогенность и инвазивность в значительной степени возрастает. Блокирование PD-L1 может привести к обратимости этих свойств. У нокаут-мышей по PD-1 происходит блокирование биохимического пути PD-L1/PD-1, и инокулированные опухолевые клетки неспособны образовать опухоли (Dong H et al. (2002) *Nat Med* 8: 793-800). По-прежнему существует необходимость в антителе к PD-L1, способном связываться с PD-L1 с высокой аффинностью и в результате блокировать связывание PD-1 и PD-L1.

Краткое изложение сущности изобретения

В некоторых аспектах настоящего изобретения для получения полностью человеческого антитела к PD-L1, проявляющего надлежащую специфичность и относительно высокую аффинность и стабильность, была использована система дрожжевого дисплея в сочетании со скринингом и созреванием аффинности, в результате чего было выполнено настоящее изобретение.

Первый аспект настоящего изобретения относится к антителу к PD-L1 или его антигенсвязывающему участку, которые включают в себя группу областей CDR, выбранных из одной из следующих:

(1) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, соответствующих SEQ ID NO: 1-3, соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответствующих SEQ ID NO: 4-6, соответственно, или последовательностей, более чем на 70, 80, 85, 90 или 95% идентичных одной из указанных выше последовательностей, соответственно;

(2) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, соответствующих SEQ ID NO: 7-9, соответственно, и последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответствующих SEQ ID NO: 10-12, соответственно, или последовательностей, более чем на 70, 80, 85, 90 или 95% идентичных одной из указанных выше последовательностей, соответственно;

(3) последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, соответствующих SEQ ID NO: 13-15,

В некоторых конкретных примерах настоящего изобретения последовательность указанного выше линкерного пептида является такой, как показано в SEQ ID NO: 67.

Любой один из примеров антител к PD-L1 или их соответствующих антигенсвязывающих участков, входящих в состав первого аспекта настоящего изобретения, соответствует полноразмерному антителу.

В любом одном из примеров антител к PD-L1 или их соответствующих антигенсвязывающих участков, составляющих первый аспект настоящего изобретения, константная область тяжелой цепи выбрана из группы, включающей в себя IgG, IgM, IgE, IgD и IgA.

В некоторых примерах настоящего изобретения константная область тяжелой цепи выбрана из группы, включающей в себя IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

В конкретных примерах настоящего изобретения константная область тяжелой цепи соответствует IgG1.

В некоторых конкретных примерах настоящего изобретения аминокислотная последовательность IgG1 является такой, как показано в SEQ ID NO: 68.

В любом одном из примеров антител к PD-L1 или их соответствующих антигенсвязывающих участков, входящих в состав первого аспекта настоящего изобретения, константная область легкой цепи представляет собой κ -область или λ -область.

В некоторых конкретных примерах настоящего изобретения аминокислотная последовательность константной κ -области легкой цепи является такой, как показано в SEQ ID NO: 70.

В некоторых конкретных примерах настоящего изобретения аминокислотная последовательность константной λ -области легкой цепи является такой, как показано в SEQ ID NO: 72.

Второй аспект настоящего изобретения относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела, где указанная выше вариабельная область тяжелой цепи антитела включает в себя группу аминокислотных последовательностей, выбранных из следующих: (i) SEQ ID NO: 1-3; (ii) SEQ ID NO: 7-9; (iii) SEQ ID NO: 13-15; (iv) SEQ ID NO: 1, 2 и 19; (v) SEQ ID NO: 7, 20 и 9.

Второй аспект настоящего изобретения составляет любая одна из молекул нуклеиновой кислоты, где указанная выше вариабельная область тяжелой цепи антитела включает группу последовательностей нуклеиновой кислоты, выбранных из следующих: SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 или последовательностей, образованных путем замены одной или нескольких аминокислот, содержащихся в каркасной области указанных выше последовательностей.

В некоторых примерах настоящего изобретения указанная выше нуклеиновая кислота включает последовательность, выбранную из показанных в SEQ ID NO: 57-61.

В некоторых примерах настоящего изобретения указанная выше нуклеиновая кислота также содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую константную область тяжелой цепи антитела, где указанная константная область тяжелой цепи антитела выбрана из группы, включающей в себя IgG, IgM, IgE, IgD и IgA.

В некоторых примерах настоящего изобретения константная область тяжелой цепи выбрана из группы, включающей в себя IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

В конкретном примере настоящего изобретения константная область тяжелой цепи соответствует IgG1.

В конкретном примере настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты IgG1 является такой, как показано в SEQ ID NO: 69.

Третий аспект настоящего изобретения относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, способную кодировать вариабельную область легкой цепи антитела, где указанная выше вариабельная область легкой цепи антитела включает в себя группу аминокислотных последовательностей, выбранных из следующих: (i) SEQ ID NO: 4-6; (ii) SEQ ID NO: 10-12; (iii) SEQ ID NO: 16-18; (iv) SEQ ID NO: 21, 17 и 18.

Третий аспект настоящего изобретения составляет любая одна из молекул нуклеиновой кислоты, где указанная выше вариабельная область легкой цепи антитела включает группу последовательностей нуклеиновой кислоты, выбранных из следующих: SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 или последовательностей, образованных путем замены одной или нескольких аминокислот, содержащихся в каркасной области одной из указанных выше последовательностей.

В некоторых аспектах настоящего изобретения указанная выше нуклеиновая кислота включает последовательность, выбранную из показанных в SEQ ID NO: 62-66.

В некоторых аспектах настоящего изобретения указанная выше нуклеиновая кислота также содержит последовательность нуклеиновой кислоты, способную кодировать константную область легкой цепи антитела, где указанная константная область легкой цепи антитела представляет собой κ -область или λ -область.

В конкретном аспекте настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты константной κ -области легкой цепи является такой, как показано в SEQ ID NO: 70.

В конкретном аспекте настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты кон-

стантной λ -области легкой цепи является такой, как показано в SEQ ID NO: 72.

Четвертый аспект настоящего изобретения относится к вектору, содержащему любую одну из нуклеиновых кислот, входящих в состав второго или третьего аспекта настоящего изобретения. Любой один из векторов, входящих в состав четвертого аспекта настоящего изобретения, содержит любую одну из нуклеиновых кислот, входящих в состав второго аспекта настоящего изобретения, и любую одну из нуклеиновых кислот, входящих в состав третьего аспекта настоящего изобретения.

Пятый аспект настоящего изобретения относится к клетке-хозяину, содержащей любую одну из нуклеиновых кислот, входящих в состав второго или третьего аспекта настоящего изобретения, или любой один из векторов, входящих в состав четвертого аспекта настоящего изобретения.

Шестой аспект настоящего изобретения относится к конъюгату, содержащему любое одно из антител к PD-L1 или соответствующих антигенсвязывающих участков, входящих в состав первого аспекта настоящего изобретения, а также другие биологически активные вещества, где указанное выше антитело к PD-L1 или соответствующий антигенсвязывающий участок конъюгированы с другим биологически активным веществом либо непосредственно, либо посредством линкерного фрагмента.

В некоторых аспектах настоящего изобретения указанное выше дополнительное биологически активное вещество выбрано из группы, включающей химические вещества, токсины, полипептиды, ферменты, изотопы, цитокины или другие отдельные биологически активные вещества или их смеси, которые способны прямо или косвенно ингибировать рост клеток или уничтожать клетки либо альтернативно ингибирующие рост клеток или уничтожающие клетки посредством активации иммунного ответа, например, ауристин монометилауристин Е (ММАЕ), ауристин монометилауристин F (ММАF), майтанзин DM1, майтанзин DM4, калихеамицин, дуокармицин MGBA, доксорубицин, рицин, дифтерийный токсин и другие родственные токсины, I131, интерлейкины, факторы некроза опухоли, хемокины, наночастицы и т.д.

Седьмой аспект настоящего изобретения относится к композиции (такой как фармацевтическая композиция), содержащей любое одно из антител к PD-L1 или соответствующих антигенсвязывающих участков, входящих в состав первого аспекта настоящего изобретения, любую одну из нуклеиновых кислот, входящих в состав второго или третьего аспекта настоящего изобретения, любой один из векторов, входящих в состав четвертого аспекта настоящего изобретения, любую одну из клеток-хозяев, входящих в состав пятого аспекта настоящего изобретения, или любой один из конъюгатов, входящих в состав шестого аспекта настоящего изобретения, а также фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество и любое(ые) другое(ие) биологически активное(ые) вещество (вещества).

Седьмой аспект настоящего изобретения составляет любая одна из композиций (такая как фармацевтическая композиция), где указанные выше дополнительные биологически активные вещества включают без ограничений другие антитела, химерные белки или лекарственные средства (например, такие противораковые лекарственные средства, как химиотерапевтические или радиотерапевтические лекарственные средства).

Настоящее изобретение дополнительно относится к реагенту или набору реагентов, содержащему любое одно из антител к PD-L1 или соответствующих антигенсвязывающих участков, входящих в состав первого аспекта настоящего изобретения, где указанный выше детектирующий реагент или набор реагентов применяют для обнаружения наличия или отсутствия белка PD-L1 или его производных.

Настоящее изобретение дополнительно относится к диагностическому реагенту или набору реагентов для диагностики, содержащему любое одно из антител к PD-L1 или соответствующих антигенсвязывающих участков, входящих в состав первого аспекта настоящего изобретения, где указанный выше диагностический реагент или набор реагентов применяют для диагностики заболевания, связанного с PD-L1 (например, таких опухолей или вирусных инфекций, как случаи вирусных инфекций, при которых характерна высокая экспрессия PD-L1, или опухолей, проявляющих высокую экспрессию PD-L1).

В некоторых аспектах настоящего изобретения указанное выше антитело к PD-L1 или соответствующий антигенсвязывающий участок дополнительно связаны с флуоресцентным красителем, химическим веществом, полипептидом, ферментом, изотопом, меткой и т.д., которые можно применять при детектировании или которые можно детектировать с помощью отдельного реагента.

В некоторых аспектах настоящего изобретения указанные выше опухоли включают без ограничений рак легкого, рак яичника, рак ободочной кишки, колоректальный рак, меланомы, рак почки, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак печени, лимфомы, гематологические злокачественные новообразования, рак головы и шеи, глиомы, рак желудка, рак носоглотки, рак гортани, рак шейки матки, рак тела матки, остеосаркомы, рак щитовидной железы и рак предстательной железы.

В некоторых аспектах настоящего изобретения указанные выше вирусные инфекции включают без ограничений острый, подострый или хронический гепатит В (HBV), гепатит С (HCV) или острые, подострые и хронические инфекции, вызванные вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

Настоящее изобретение дополнительно относится к областям применения, в которых любое одно из антител к PD-L1 или соответствующих антигенсвязывающих участков, входящих в состав первого аспекта настоящего изобретения, любую одну из нуклеиновых кислот, входящих в состав второго или третьего аспекта настоящего изобретения, любой один из векторов, входящих в состав четвертого аспекта

настоящего изобретения, любую одну из клеток-хозяев, входящих в состав пятого аспекта настоящего изобретения, любой один из конъюгатов, входящих в состав шестого аспекта настоящего изобретения, или любую одну из композиций, входящих в состав седьмого аспекта настоящего изобретения, используют для получения лекарственного средства, применяемого в профилактике или лечении заболеваний, связанных с PD-L1 (например, таких опухолей или вирусных инфекций, как случаи вирусных инфекций, при которых характерна высокая экспрессия PD-L1, или опухолей, проявляющих высокую экспрессию PD-L1).

В некоторых аспектах настоящего изобретения указанные выше опухоли относятся к таким PD-L1-связанным опухолям, как опухоли, проявляющие высокую экспрессию PD-L1.

В конкретных аспектах настоящего изобретения указанные выше опухоли включают без ограничений рак легкого, рак яичника, рак ободочной кишки, колоректальный рак, меланомы, рак почки, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак печени, лимфомы, гематологические злокачественные новообразования, рак головы и шеи, глиомы, рак желудка, рак носоглотки, рак гортани, рак шейки матки, рак тела матки, остеосаркомы, рак щитовидной железы и рак предстательной железы.

В некоторых аспектах настоящего изобретения указанные выше вирусные инфекции включают без ограничений острый, подострый или хронический гепатит В (HBV), гепатит С (HCV) или острые, подострые и хронические инфекции, вызванные вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

Настоящее изобретение дополнительно относится к областям применения, в которых любое одно из антител к PD-L1 или соответствующих антигенсвязывающих участков, входящих в состав первого аспекта изобретения, применяют для получения диагностического реагента или набора реагентов для диагностики заболеваний, связанных с PD-L1 (например, таких опухолей или вирусных инфекций, как случаи вирусных инфекций, при которых характерна высокая экспрессия PD-L1, или опухолей, проявляющих высокую экспрессию PD-L1).

В некоторых аспектах настоящего изобретения указанные выше опухоли относятся к таким PD-L1-связанным опухолям, как опухоли, проявляющие высокую экспрессию PD-L1.

В конкретных аспектах настоящего изобретения указанные выше опухоли включают без ограничений рак легкого, рак яичника, рак ободочной кишки, колоректальный рак, меланомы, рак почки, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак печени, лимфомы, гематологические злокачественные новообразования, рак головы и шеи, глиомы, рак желудка, рак носоглотки, рак гортани, рак шейки матки, рак тела матки, остеосаркомы, рак щитовидной железы и рак предстательной железы.

В некоторых аспектах настоящего изобретения указанные выше вирусные инфекции включают без ограничений острый, подострый или хронический гепатит В (HBV), гепатит С (HCV) или острые, подострые и хронические инфекции, вызванные вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

В некоторых аспектах настоящего изобретения указанное выше антитело к PD-L1 или соответствующий антигенсвязывающий участок дополнительно связаны с флуоресцентным красителем, химическим веществом, полипептидом, ферментом, изотопом, меткой и т.д., которые можно применять при детектировании или которые можно детектировать с помощью отдельного реагента.

Настоящее изобретение дополнительно относится к областям применения, в которых любое одно из антител к PD-L1 или соответствующих антигенсвязывающих участков, входящих в состав первого аспекта изобретения, используют для получения лекарственного средства для профилактики или лечения заболеваний, связанных с CD80.

В контексте настоящего изобретения заболевания, связанные с CD80, как указано выше, включают заболевания, связанные с высокой экспрессией CD80.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу, применяемому для профилактики или лечения заболеваний, связанных с PD-L1 (таких опухолей или вирусных инфекций, как случаи вирусных инфекций, при которых характерна высокая экспрессия PD-L1, или опухолей, проявляющих высокую экспрессию PD-L1), где указанный выше способ включает предоставление субъекту эффективной профилактической или терапевтической дозы любого одного из антител к PD-L1 или соответствующих антигенсвязывающих участков, входящих в состав первого аспекта настоящего изобретения, любой одной из нуклеиновых кислот, входящих в состав второго или третьего аспектов настоящего изобретения, любого одного из векторов, входящих в состав четвертого аспекта настоящего изобретения, любой одной из клеток-хозяев, входящих в состав пятого аспекта настоящего изобретения, любого одного из конъюгатов, входящих в состав шестого аспекта настоящего изобретения, или любой одной из композиций, входящих в состав седьмого аспекта настоящего изобретения, в сочетании с назначением опциональной радиотерапии (такой, как облучение рентгеновскими лучами).

В некоторых аспектах настоящего изобретения указанные выше опухоли относятся к таким PD-L1-связанным опухолям, как опухоли, проявляющие высокую экспрессию PD-L1.

В конкретных аспектах настоящего изобретения указанные выше опухоли включают без ограничений рак легкого, рак яичника, рак ободочной кишки, колоректальный рак, меланомы, рак почки, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак печени, лимфомы, гематологические злокачественные новообразования, рак головы и шеи, глиомы, рак желудка, рак носоглотки, рак гортани, рак шейки матки, рак тела матки, остеосаркомы, рак щитовидной железы и рак предстательной железы.

В некоторых аспектах настоящего изобретения указанные выше вирусные инфекции включают без ограничений острый, подострый или хронический гепатит В (HBV), гепатит С (HCV) или острые, подострые и хронические инфекции, вызванные вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу, применяемому для профилактики или лечения заболеваний, связанных с CD80, где указанный выше способ включает предоставление субъекту эффективной профилактической или терапевтической дозы любого одного из антител к PD-L1 или соответствующих антигенсвязывающих участков, входящих в состав первого аспекта настоящего изобретения.

В контексте настоящего изобретения заболевания, связанные с CD80, как указано выше, включают заболевания, связанные с высокой экспрессией CD80.

Настоящее изобретение дополнительно описано в приведенном ниже тексте.

В контексте настоящего изобретения, если не указано иное, используемые в тексте технические и научные термины должны соответствовать своим обычно используемым значениям, понятным специалисту в данной области. Кроме того, все используемые в тексте термины, относящиеся к химии белков и нуклеиновых кислот, молекулярной биологии, клеточным и тканевым культурам, микробиологии и иммунологии, а также к лабораторным методикам, соответствуют терминам и стандартным методикам, широко применяемым в соответствующих областях. Тем не менее, определения и пояснения соответствующих терминов приведены ниже в целях лучшего объяснения настоящего изобретения.

В контексте настоящего изобретения термин "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, которая обычно состоит из двух пар идентичных полипептидных цепей (при этом каждая пара имеет одну "легкую" (L) и одну "тяжелую" (H) цепь). Легкие цепи антитела можно классифицировать как легкие κ - или λ -цепи. Тяжелые цепи можно классифицировать либо как μ , δ , γ , α или ϵ , либо как соответствующие им изоформы антитела, определяемые как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Вариабельные и константные области легких и тяжелых цепей соединены приблизительно 12 или большим количеством аминокислотных "J" областей, при этом тяжелые цепи также содержат приблизительно 3 или более аминокислотных "D" областей. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Константная область тяжелой цепи состоит из трех структурных доменов (CH1, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Константная область легкой цепи состоит из одного структурного домена (CL). Константная область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями и факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки), а также первый компонент классической системы комплемента (C1q). Области VH и VL можно дополнительно подразделить на области с высокой вариабельностью (известные как области, определяющие комплементарность (CDR)), разделенные между собой более консервативными областями, известными как каркасные области (FR). Каждая VH и VL состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Вариабельные области (VH и VL) каждой пары тяжелой цепи/легкой цепи, соответственно, образуют каждый из связывающих участков антитела. При определении аминокислот в каждой области или структурном домене руководствуются номенклатурой Кабата (Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md (1987 and 1991)) или определением, данным в работах Хотиа (Chothia) и Леск (Lesk) (Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342: 878-883). Термин "антитело" не подлежит каким-либо конкретным ограничениям в отношении способа получения антитела. Например, оно включает, в частности, рекомбинантные антитела, моноклональные антитела и поликлональные антитела. Антитела могут относиться к различным изоформам, включающим, например, антитела IgG (например, подтипы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM.

В контексте настоящего изобретения "антигенсвязывающий участок" антитела относится к одной или большему количеству частей вдоль всей длины антитела, где указанная часть сохраняет способность к связыванию с тем же антигеном, с которым связывается данное антитело (например, PD-L1), и конкурирует с интактными антителами за специфическое связывание с этим антигеном. Общее описание см. в пособии "Фундаментальная иммунология" (Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd edition, Raven Press, NY (1989)), которое включено в настоящий документ для всех целей посредством ссылки на полный текст. Антигенсвязывающие участки могут быть получены методами рекомбинантных ДНК или путем ферментативного или химического расщепления полноразмерных антител. В некоторых случаях антигенсвязывающий участок включает Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, фрагмент области, определяющей комплементарность (CDR), одноцепочечное антитело (например, scFv), химерное антитело, диатело и подобные полипептиды, включающие по меньшей мере участок антитела, способный придавать полипептид-специфичную антигенсвязывающую способность.

В контексте настоящего изобретения термин "фрагмент Fd" относится к фрагменту антитела, состоящему из структурных доменов VH и CH1; термин "фрагмент Fv" относится к фрагменту антитела, состоящему из структурных доменов VL и VH одного плеча антитела; термин "фрагмент dAb" относится к фрагменту антитела, состоящему из структурного домена VH (Ward et al., Nature 341: 544-546 (1989)); термин "фрагмент Fab" относится к фрагменту антитела, состоящему из структурных доменов VL, VH,

CL и CH1; и термин "фрагмент F(ab')₂" относится к фрагменту антитела, включающему два фрагмента Fab, соединенные дисульфидной связью в шарнирной области.

В некоторых случаях антигенсвязывающий участок антитела представляет собой одноцепочечное антитело (например, scFv), где структурные домены VL и VH образуют одновалентную молекулу посредством спаривания, позволяющего получить ее в виде единой полипептидной цепи с помощью линкера (см., например, работы Берда с соавт. (Bird et al., Science 242: 423-426 (1988)) и Хастона с соавт. (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988)). Такая молекула scFv может иметь общую структуру: NH₂-VL-линкер-VH-COOH или NH₂-VH-линкер-VL-COOH. Подходящие традиционные линкеры (соединительные пептиды) состоят из повторяющихся аминокислотных последовательностей GGGGS или их вариантов. Например, можно использовать линкер с аминокислотной последовательностью (GGGGS)₄, но также можно использовать его варианты (Holliger et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448). Другие линкеры, которые можно использовать для настоящего изобретения, описаны в работе Алфтана с соавт. (Alfthan et al. (1995), Protein Eng. 8: 725-731), Чои с соавт. (Choi et al. (2001), Eur. J. Immunol. 31: 94-106), Ху с соавт. (Hu et al. (1996), Cancer Res. 56: 3055-3061), Киприянова с соавт. (Kipriyanov et al. (1999), J. Mol. Biol. 293: 41-56) и Руверс с соавт. (Roovers et al. (2001), Cancer Immunol.). В аспекте настоящего изобретения последовательность указанного выше линкерного пептида представляет собой (GGGGS)₃.

В некоторых случаях антитело состоит из биспецифического антитела, способного к связыванию, соответственно, двух различных видов антигенов или антигенных эпитопов и включающего легкую цепь и тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающий участок, которые специфично связываются с первым антигеном, а также легкую цепь и тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающий участок, которые специфично связываются со вторым антигеном. В некоторых аспектах настоящего изобретения легкая цепь и тяжелая цепь антитела или его антигенсвязывающий участок, которые специфично связываются с первым антигеном, включенные в указанное выше биспецифическое антитело, могут соответствовать любому одному из антител или соответствующих антигенсвязывающих участков, входящих в состав первого аспекта настоящего изобретения, а легкая цепь и тяжелая цепь антитела или его антигенсвязывающий участок, которые специфично связываются со вторым антигеном, включенные в указанное выше биспецифическое антитело, могут соответствовать другому антителу к PD-L1 или соответствующему антигенсвязывающему участку или антителу, нацеленному на другой антиген, или соответствующему антигенсвязывающему участку.

В некоторых случаях антитела соответствуют диателам, т.е. двухвалентным антителам, где структурные домены VH и VL экспрессируются на одной полипептидной цепи, но при этом используется слишком короткий линкер, не допускающий спаривание между структурными доменами на одной цепи, в результате чего структурные домены вынуждены спариваться с комплементарными структурными доменами на другой цепи и образуют два антигенсвязывающих участка (см., например, работы Холлигера П. с соавт. (Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)), и Полджак Р. Дж. с соавт. (Poljak R.J. et al., Structure 2: 1121-1123 (1994)).

Традиционные методы, известные специалистам в данной области (например, методы рекомбинантных ДНК или ферментативного или химического расщепления), можно использовать для получения антигенсвязывающего участка (например, фрагмента антитела, как описано выше) из данного антитела (такого, как моноклональное антитело 2E12) и селективного скрининга антигенсвязывающих участков антитела с использованием таких же способов, как для полноразмерных антител.

В контексте настоящего изобретения указанные выше антигенсвязывающие участки включают одноцепочечные антитела (scFv), химерные антитела, диатела, бивалентные молекулы scFv-Fc, dAb и фрагменты области, определяющей комплементарность (CDR), фрагменты Fab, фрагменты Fd, фрагменты Fab' и фрагменты Fv и F(ab')₂.

В контексте настоящего изобретения константные области тяжелой цепи IgG1, как указано выше, включают такие аллотипы, как G1m(f), G1m(z), G1m(z,a) и G1m(z,a,x). В некоторых аспектах настоящего изобретения указанная выше константная область тяжелой цепи IgG1 соответствует G1m(f).

В контексте настоящего изобретения указанная выше константная область легкой цепи к включает такие различные аллотипы, как Km1, Km1,2 и Km3. В некоторых аспектах настоящего изобретения указанная выше константная область легкой цепи к соответствует области типа Km3.

В контексте настоящего изобретения указанная выше константная область легкой цепи λ включает такие различные аллотипы, как λI, λII, λIII и λVI. В некоторых аспектах настоящего изобретения указанная выше константная область легкой цепи λ соответствует области типа λII.

Нуклеиновые кислоты антитела, к которым относится настоящее изобретение, также могут быть получены традиционными генно-инженерными рекомбинантными методами или способами химического синтеза. С одной стороны, последовательности нуклеиновых кислот антитела, к которым относится настоящее изобретение, включают переменные области тяжелой цепи антитела к PD-L1 или частичные последовательности нуклеиновых кислот, принадлежащих молекулам антитела. С другой стороны, последовательности нуклеиновых кислот антитела, к которым относится настоящее изобретение, также

включают переменные области легкой цепи антитела к PD-L1 или частичные последовательности нуклеиновых кислот, принадлежащих молекулам антитела. Кроме того, с другой стороны, последовательности нуклеиновых кислот антитела, к которым относится настоящее изобретение, также дополнительно включают последовательности CDR, принадлежащие переменным областям тяжелой цепи и легкой цепи. Область, определяющая комплементарность (CDR), представляет собой участок, который связывается с эпитопом антигена, и в контексте настоящего изобретения последовательности CDR проверяют с помощью программы IGM/V-QUEST (<http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>). Тем не менее, последовательности CDR, полученные другими способами контекстного анализа, отличаются лишь незначительно.

Один аспект настоящего изобретения относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи антител B60-55, ВП61-62, B50-6, B60, ВП61 и B50. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие последовательности переменных областей тяжелой цепи антител B60-55, ВП61-62, B50-6, B60, ВП61 и B50, соответствуют SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 59, соответственно. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие последовательности переменных областей легкой цепи антител B60-55, ВП61-62, B50-6, B60, ВП61 и B50, соответствуют SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66, соответственно. Настоящее изобретение также относится к вариантам или аналогам молекул нуклеиновых кислот, кодирующих последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи антител B60-55, ВП61-62, B50-6, B60, ВП61 и B50.

С другой стороны, настоящее изобретение также относится к различным вариантам выделенных молекул нуклеиновых кислот; в частности, последовательность указанных вариантов нуклеиновых кислот должна проявлять по меньшей мере 70%-е подобие следующим последовательностям нуклеиновых кислот: SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66, при этом предпочтительно подобие, достигающее по меньшей мере 75%, более предпочтительно подобие, достигающее по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно подобие, достигающее по меньшей мере 85%, еще более предпочтительно подобие, достигающее по меньшей мере 90%, и наиболее предпочтительно подобие, достигающее по меньшей мере 95%.

Настоящее изобретение дополнительно относится к соответствующим выделенным молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим последовательности переменных областей тяжелой цепи антител B60-55, ВП61-62, B50-6, B60, ВП61 и B50 в форме аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 47, 49, 51, 53, 54 и 51. Настоящее изобретение также относится к соответствующим молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим последовательности переменных областей легкой цепи антител B60-55, ВП61-62, B50-6, B60, ВП61 и B50 в форме аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 48, 50, 52, 48, 55 и 56.

Настоящее изобретение относится к рекомбинантному экспрессионному вектору, содержащему указанные выше молекулы нуклеиновых кислот, и дополнительно относится к клетке-хозяину, трансформированной указанными молекулами. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам, используемым для культивирования клеток-хозяев, которые содержат указанные выше молекулы нуклеиновых кислот, в определенных условиях с их последующим выделением для получения антител, как описано в изобретении.

Аминокислотные последовательности антитела.

Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи моноклонального антитела mAb B60-55, ВП61-62, B50-6, B60, ВП61 и B50 могут быть получены из соответствующих последовательностей нуклеиновых кислот. Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи mAb B60-55, ВП61-62, B50-6, B60, ВП61 и B50 соответствуют SEQ ID NO: 47, 49, 51, 53, 54, и 51 соответственно. Аминокислотные последовательности переменных областей легкой цепи mAb B60-55, ВП61-62, B50-6, B60, ВП61 и B50 соответствуют SEQ ID NO: 48, 50, 52, 48, 55 и 56, соответственно.

С другой стороны, аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи антител, предложенных в настоящем изобретении, должны проявлять по меньшей мере 70%-е подобие последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 47, 49, 51, 53, 54 и 51, при этом предпочтительно подобие, достигающее по меньшей мере 80%, более предпочтительно подобие, достигающее по меньшей мере 85%, еще более предпочтительно подобие, достигающее по меньшей мере 90%, и наиболее предпочтительно подобие, достигающее по меньшей мере 95%.

С другой стороны, аминокислотные последовательности переменных областей легкой цепи антител, предложенных в настоящем изобретении, должны проявлять по меньшей мере 70%-е подобие последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 48, 50, 52, 48, 55 и 56, при этом предпочтительно подобие, достигающее по меньшей мере 80%, более предпочтительно подобие, достигающее по меньшей мере 85%, еще более предпочтительно подобие, достигающее по меньшей мере 90%, и наиболее предпочтительно подобие, достигающее по меньшей мере 95%.

Аминокислотные последовательности CDR переменных областей тяжелой и легкой цепи антител B60-55, ВП61-62, B50-6, B60, ВП61 и B50 являются такими, как определено ниже.

Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи антитела B60-55 соответствуют SEQ ID NO: 1-3, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела B60-55 соответствуют SEQ ID NO: 4-6, соответственно.

Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи антитела BII61-62 соответствуют SEQ ID NO: 7-9, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела BII61-62 соответствуют SEQ ID NO: 10-12, соответственно.

Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи антитела B50-6 соответствуют SEQ ID NO: 13-15, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела B50-6 соответствуют SEQ ID NO: 16-18, соответственно.

С другой стороны, аминокислотная последовательность, содержащаяся в CDR тяжелой цепи антитела к PD-L1 или его фрагмента, может быть получена посредством одной или более мутаций, добавлений или делеций аминокислот SEQ ID NO: 1-3, 7-9, 13-15, 19 и 20. Предпочтительное количество аминокислот, подвергаемых мутации, добавлению или делеции, не должно превышать трех. Более предпочтительное количество аминокислот, подвергаемых мутации, добавлению или делеции, не должно превышать двух. Наиболее предпочтительное количество аминокислот, подвергаемых мутации, добавлению или делеции, не должно превышать одной.

С другой стороны, аминокислотная последовательность, содержащаяся в CDR легкой цепи антитела к PD-L1 или его фрагмента, может быть получена посредством одной или более мутаций, добавлений или делеций аминокислот SEQ ID NO: 4-6, 10-12, 16-18 и 21. Предпочтительное количество аминокислот, подвергаемых мутации, добавлению или делеции, не должно превышать трех. Более предпочтительное количество аминокислот, подвергаемых мутации, добавлению или делеции, не должно превышать двух. Наиболее предпочтительное количество аминокислот, подвергаемых мутации, добавлению или делеции, не должно превышать одной.

Аминокислотные последовательности FR переменных областей тяжелой и легкой цепи антител B60-55, BII61-62, B50-6, B60, BII61 и B50 являются такими, как определено ниже.

Последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 переменных областей тяжелой цепи антител B60-55 и B60 соответствуют SEQ ID NO: 22-25, соответственно. Последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 переменных областей легкой цепи соответствуют SEQ ID NO: 26-29, соответственно.

Последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 переменной области тяжелой цепи антитела BII61-62 соответствуют SEQ ID NO: 30-33, соответственно. Последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 переменной области легкой цепи соответствуют SEQ ID NO: 34-37, соответственно.

Последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 переменных областей тяжелой цепи антител B50-6 и B50 соответствуют SEQ ID NO: 38-41, соответственно. Последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 переменной области легкой цепи соответствуют SEQ ID NO: 42-45, соответственно.

Последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 переменной области тяжелой цепи антитела BII61 соответствуют SEQ ID NO: 30-33, соответственно. Последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 переменной области легкой цепи соответствуют SEQ ID NO: 34, 46, 36, 37, соответственно.

С другой стороны, аминокислотная последовательность, содержащаяся в FR переменной области тяжелой цепи антитела к PD-L1, может быть получена посредством одной или более мутаций, добавлений или делеций аминокислот SEQ ID NO: 22-46. Предпочтительное количество аминокислот, подвергаемых мутации, добавлению или делеции, не должно превышать трех. Более предпочтительное количество аминокислот, подвергаемых мутации, добавлению или делеции, не должно превышать двух. Наиболее предпочтительное количество аминокислот, подвергаемых мутации, добавлению или делеции, не должно превышать одной.

Варианты, полученные вследствие мутации, добавления или делеции аминокислоты, содержащейся в указанном выше антителе, CDR или каркасной области, должны сохранить способность к специфическому связыванию с PD-L1 человека. Настоящее изобретение также включает такие варианты антигенсвязывающего участка.

Вариантом указанных выше антител является антитело B60-55-1, включающее в себя полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 85 и полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 87, при этом концевой остаток лизина на С-конце тяжелой цепи может отсутствовать. Тяжелую цепь B60-55-1 можно экспрессировать, используя последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 86. Эта последовательность нуклеиновой кислоты может быть встроена в экспрессионный вектор для дальнейшего встраивания в экспрессирующую линию клеток. Легкую цепь B60-55-1 можно экспрессировать, используя последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 88. Эта последовательность нуклеиновой кислоты может быть встроена в экспрессионный вектор для дальнейшего встраивания в экспрессирующую линию клеток.

Препарат антитела B60-55-1 можно готовить в виде фармацевтической композиции путем добавления фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества или адьюванта. Эта композиция может содержать 275 ммоль/л серина, около 10 ммоль/л гистидина и иметь величину pH около 5,9. Эта композиция может содержать около 0,05% полисорбата 80, около 1% D-маннитола, около 120 ммоль/л L-пролина, около 100 ммоль/л L-серина, около 10 ммоль/л L-гистидина HCl и иметь pH около 5,8.

Варианты моноклональных антител, входящих в состав настоящего изобретения, могут быть получены традиционными методами генной инженерии. Специалистам в данной области полностью известны способы, в которых применяют мутацию нуклеиновой кислоты для модификации молекул ДНК. Дополнительно молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих варианты тяжелой цепи и легкой цепи, могут быть также получены путем химического синтеза.

В контексте настоящего изобретения примеры алгоритмов, используемых для определения идентичности последовательностей и подобия последовательностей в процентах, включают BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в работах Альтшул с соавт. (Altschul et al. (1977) Nucl. Acid. Res. 25: 3389-3402; Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410, соответственно). Например, применяя описанные в литературе параметры или параметры по умолчанию, BLAST и BLAST 2.0 можно использовать для определения процента подобия аминокислотных последовательностей, входящих в состав настоящего изобретения. Программное обеспечение, позволяющее провести анализ BLAST, может быть получено любым членом общества через Национальный центр биотехнологической информации.

В контексте настоящего изобретения аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные данной аминокислотной последовательности, как указано выше, включают полипептидные последовательности, в основном идентичные указанной аминокислотной последовательности, а именно последовательности, определенные как по меньшей мере на 70% идентичные полипептидной последовательности, входящей в состав настоящего изобретения, при использовании описанных в настоящем документе способов (например, анализа BLAST с применением стандартных параметров), при этом предпочтительны последовательности, проявляющие идентичность по меньшей мере 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более.

В контексте настоящего изобретения термин "вектор" относится к такому типу носителя для доставки нуклеиновой кислоты, который включает в себя полинуклеотид, кодирующий определенный белок, и обеспечивает возможность для экспрессии указанного белка. Вектор обеспечивает возможность экспрессии компонента(-ов) генетического материала, который он переносит в клетку-хозяина посредством трансформации, трансдукции или трансфекции указанной клетки-хозяина. Например, векторы включают плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, в частности, дрожжевую искусственную хромосому (yeast artificial chromosome, YAC), бактериальную искусственную хромосому (bacterial artificial chromosome, BAC) или искусственную хромосому P1-происхождения (P1-derived artificial chromosome, PAC); такие бактериофаги, как фаг λ или фаг M13, и вирусы животных. Примеры вирусов животных, используемых в качестве векторов, включают ретровирусы (в том числе лентивирусы), аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса (такие, как вирус простого герпеса), поксвирусы, бакуловирусы, вирусы папилломы и паповавирусы (например, SV40). Вектор может содержать несколько элементов контроля экспрессии, включающих промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, элементы отбора и гены-репортеры. Кроме того, вектор может содержать точку начала репликации. Векторы могут также включать в себя элементы, способствующие проникновению в клетку, в частности, вирусные частицы, липосомы или белок оболочки, но указанные компоненты не ограничены этими веществами.

В контексте настоящего изобретения термин "клетка-хозяин" относится к клетке, в которую вводят вектор, включая множество разнообразных типов клеток, в том числе такие прокариотические клетки, как *E. coli* или *B. subtilis*, такие клетки грибов, как клетки дрожжей или аспергилла, такие клетки насекомых, как клетки дрозофилы S2 или Sf9, или такие клетки животных, как фибробласты, клетки CHO, клетки COS, клетки NS0, клетки HeLa, клетки ВНК, клетки НЕК 293 или другие клетки человека.

Фрагменты антител, входящие в состав настоящего изобретения, могут быть получены путем гидролиза полноразмерных молекул антитела (см. работы Моримото с соавт. (Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods 24: 107-117 (1992)) и Бреннан с соавт. (Brennan et al., Science 229: 81 (1985)). Дополнительно эти фрагменты антител могут быть также напрямую получены из рекомбинантных клеток-хозяев (обзор см. в работах Хадсона (Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11: 548-557 (1999)); Литтл с соавт. (Little et al., Immunol. Today, 21: 364-370 (2000)). Например, фрагменты Fab' можно получать непосредственно из клеток *E. coli* или подвергать химическому сочетанию с образованием фрагментов F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology, 10: 163-167 (1992)). В другом примере фрагменты F(ab')₂ могут быть получены с помощью соединения с использованием лейциновой "застежки-молнии" GCN4. Дополнительно фрагменты Fv, Fab или F(ab')₂ могут быть также непосредственно выделены из питательной среды культивирования рекомбинантных клеток-хозяев. Обычному специалисту в данной области также должны быть полностью известны другие методы получения фрагментов антитела.

В контексте настоящего изобретения термин "специфичное связывание" относится к реакции неслучайного связывания между двумя молекулами, например, реакции, происходящей между антителом и соответствующим антигеном. В данном случае связывающая аффинность антитела, которое связывает первый антиген, ко второму антигену является очень слабой или неопределяемой. В некоторых аспектах антитело, специфичное к данному антигену, связывает указанный антиген с аффинностью (KD) $\leq 10^{-5}$ M (например, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M или 10^{-10} M), где KD относится к отношению скорости диссо-

циации к скорости связывания (k_{off}/k_{on}) и может быть определена количественно способами, известными специалисту в данной области.

В некоторых аспектах настоящего изобретения антитело к PD-L1, входящее в состав настоящего изобретения, способно к специфичному связыванию PD-L1 человека и одновременно также связывается с PD-L1 мыши, но не связывается с PD-L2 или B7H3.

В некоторых аспектах настоящего изобретения антитело к PD-L1, входящее в состав настоящего изобретения, способно к конкурентному связыванию hPD-L1 по отношению к hPD-1.

В контексте настоящего изобретения заболевания, связанные с PD-L1, включают, например, опухоли и вирусные инфекции, которые связаны с PD-L1, в частности, опухоли и вирусные инфекции, сопровождающиеся высоким уровнем экспрессии PD-L1.

В некоторых аспектах настоящего изобретения указанные выше опухоли включают без ограничений рак легкого, рак яичника, рак ободочной кишки, колоректальный рак, меланомы, рак почки, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак печени, лимфомы, гематологические злокачественные новообразования, рак головы и шеи, глиомы, рак желудка, рак носоглотки, рак гортани, рак шейки матки, рак тела матки, остеосаркомы, рак щитовидной железы и рак предстательной железы.

В некоторых аспектах настоящего изобретения указанные выше вирусные инфекции включают без ограничений острый, подострый или хронический гепатит В (HBV), гепатит С (HCV) или острые, подострые или хронические инфекции, вызванные вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

В контексте настоящего изобретения двадцать традиционных аминокислот и их сокращенные названия соответствуют общепринятому использованию. См. кн. "Иммунология: синтез" (Immunology - A Synthesis, 2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), включенную в настоящий документ посредством ссылки.

Преимущества изобретения

Для получения полностью человеческого антитела к PD-L1, проявляющего надлежащую специфичность и относительную высокую аффинность и стабильность, в настоящем изобретении используют технологию дрожжевого дисплея в сочетании со скринингом и созреванием аффинности, при этом указанное антитело способно к специфичному связыванию с PD-L1 человека или одновременно также к связыванию с PD-L1 мыши и не связывается с B7H3 или PD-L2; и указанное антитело связывается с активированными Т-лимфоцитами, дополнительно усиливая активацию Т-лимфоцитов и приводя к значительному ингибированию роста опухоли.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Ингибирование очищенным scFv к hPD-L1 связывания лиганда с рецептором hPD-L1/hPD-1.

На оси X представлена интенсивность флуоресценции усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP), а на оси Y представлена интенсивность флуоресценции конъюгата стрептавидина и фикоэритрина (SA-PE). А - соответствует холостому контролю, В - соответствует отрицательному контролю, С - соответствует scFv B50, D - соответствует scFv B60 и Е соответствует scFv ВП61.

Фиг. 2. Дрожжи, проявляющие повышенную аффинность к hPD-L1 после скрининга созревания аффинности.

В данном случае на оси X представлена интенсивность флуоресценции тус (тус-положительная, соответствующая дрожжам, экспрессирующим фрагменты полноразмерного антитела), а на оси Y представлена интенсивность флуоресценции конъюгата стрептавидина и аллофикоцианина (SA-APC), показывающая способность к связыванию с антигеном.

Фиг. 3. Сравнение способности антител, полученных после созревания аффинности, к конкурентному связыванию hPD-L1 против hPD-1.

В данном случае горизонтальная ось соответствует концентрации антитела (единицы измерения: нг/мл), а вертикальная ось соответствует значению оптической плотности (OD).

А) показано сравнение ВП61-62 и ВП61, В) показано сравнение B50 и B50-6 и С) показано сравнение B60 и B60-55.

Фиг. 4. Количественное определение антитела к hPD-L1 и связывающей способности с hPD-L1 методом твердофазного иммуноферментного анализа (тИФА).

В данном случае горизонтальная ось соответствует концентрации антитела (единицы измерения: нг/мл), а вертикальная ось соответствует значению оптической плотности (OD).

Фиг. 5. Количественное определение конкурентного связывания hPD-L1 антитела к hPD-L1 и к hPD-1 методом конкурентного тИФА.

В данном случае горизонтальная ось соответствует концентрации антитела (единицы измерения: нг/мл), а вертикальная ось соответствует значению оптической плотности (OD).

График № 5 соответствует мАт ВП61-62, график № 2 соответствует мАт B50-6 и график № 3 соответствует мАт B60-55.

Фиг. 6. Количественное определение конкурентного связывания hPD-L1 антитела к hPD-L1 и к CD80 методом конкурентного тИФА.

Фиг. 7. Определение специфичности антитела к hPD-L1.

В данном случае на оси X представлена интенсивность флуоресценции EGFP, а на оси Y представ-

лена интенсивность флуоресценции соответствующего связывания антител, А - соответствует холостому контролю, В - соответствует отрицательному контролю, С - соответствует мАт ВП61-62, D - соответствует мАт В60-55 и E соответствует мАт В50-6;

(1) соответствует hPD-L1-белок EGFP, (2) соответствует hВ7Н3-EGFP и (3) соответствует hPD-L2-белок EGFP.

Фиг. 8. Антитело к hPD-L1 и связывающая способность с mPD-L1.

В данном случае на оси X представлена интенсивность флуоресценции EGFP, а на оси Y представлена интенсивность флуоресценции соответствующего связывания антител, А - соответствует холостому контролю, В - соответствует отрицательному контролю, С - соответствует мАт В60-55, D - соответствует мАт ВП61-62 и E соответствует мАт В50-6;

(1) соответствует hPD-L1-белок EGFP и (2) соответствует mPD-L1-белок EGFP.

Фиг. 9. Антитело к hPD-L1 и связывающая способность с PD-L1 яванского макака.

Фиг. 10. Активация CD4+ Т-лимфоцитов антителами к hPD-L1.

Фиг. 11. Ингибирующая активность антитела к hPD-L1 В50-6 в отношении роста опухоли.

Фиг. 12. Ингибирующая активность антител к hPD-L1 В60-55 и ВП61-62 в отношении роста опухоли.

В данном случае А - соответствует ингибированию роста опухоли мАт ВП61-62 и В60-55 при применении дозы 3 мг/кг; и В - соответствует ингибирующему действию мАт ВП61-62 на рост опухоли при применении различных доз.

Фиг. 13. Сравнение стабильности В60-55 и антитела 2.4Н90Р.

В данном случае А - соответствует значениям IC_{50} (полумаксимальной ингибирующей концентрации) В60-55 и антитела 2.4Н90Р в зависимости от времени; В - соответствует доле димеров антитела в зависимости от времени; и С - соответствует результатам конкурентной тИФА, полученным в ускоренном исследовании стабильности В60-55.

Фиг. 14. Хроматография В60-55-1 на CaPure-НА; время удерживания В60-55-1 соответствует приблизительно 45 мин.

Фиг. 15. Анализ очищенного В60-55-1 методом эксклюзионной хроматографии на колонке TSKgel G3000SWXL (Tosoh).

Фиг. 16. Анализ очищенного В60-55-1 методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ) с окрашиванием кумасси: дорожка 1 - в восстанавливающих условиях, дорожка 2 - в невосстанавливающих условиях, дорожка 3 - маркеры молекулярной массы.

Фиг. 17. Альтернативные подходы к иммобилизации для измерений поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Панель А: антитела к IgG человека иммобилизовали на микрочипе в качестве антител захвата; В60-55-1 или атезолизумаб захватывали иммобилизованными антителами и вносили лиганд PD-L1-His в различных концентрациях.

Панель В: химерный белок PD-L1-Fc непосредственно иммобилизовали на сенсорном микрочипе и вносили В60-55-1 или атезолизумаб в различных концентрациях.

Панель С: для исследования взаимодействий с обоими белками - химерным белком PD-L1-Fc и PD-L1-His - В60-55-1 или атезолизумаб непосредственно иммобилизовали на микрочипе; вносили PD-L1 с His-меткой или PD-L1-Fc в диапазоне концентраций.

Фиг. 18. Сенсограммы связывания лиганда PD-L1 с His-меткой с иммобилизованным антителом сравнения атезолизумабом или В60-55-1; этот подход схематически показан на левой панели, а сводные параметры кинетики приведены в таблице; античеловеческие антитела захвата иммобилизовали на сенсорном микрочипе и захватывали атезолизумаб или В60-55-1 и впоследствии добавляли лиганд PD-L1-His в различных концентрациях.

Панель А - результаты для атезолизумаба; панель В - результаты для В60-55-1.

Фиг. 19. Сенсограммы связывания атезолизумаба или В60-55-1 на иммобилизованном химерном белке PD-L1-Fc; этот подход схематически показан на левой панели, а сводные параметры кинетики приведены в таблице; на микрочип были нанесены В60-55-1 или атезолизумаб в различных концентрациях.

Панель А - результаты для атезолизумаба; панель В - результаты для В60-55-1.

Фиг. 20. Сенсограммы связывания PD-L1-His или PD-L1-Fc с иммобилизованным В60-55-1; этот подход схематически показан на левой панели, а сводные параметры кинетики приведены в таблице.

Фиг. 21. Сенсограммы связывания PD-L1-His или PD-L1-Fc с иммобилизованным атезолизумабом; этот подход схематически показан на левой панели, а сводные параметры кинетики приведены в таблице.

Фиг. 22. В60-55-1 и атезолизумаб не обладают антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC) по сравнению с контрольными антителами из набора реагентов Promega ADCC Reporter Bioassay Kit.

Фиг. 23. Оценка связывания В60-55-1 и атезолизумаба с С1q.

Фиг. 24. Зависимая от концентрации активность В60-55-1 и антител сравнения в отношении активации Т-лимфоцитов в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ).

Фиг. 25. Изменение массы тела на фоне применения лекарственного средства; стрелками указано время введения.

Фиг. 26. Уменьшение объема опухоли на фоне применения лекарственного средства; стрелками указано время введения.

Фиг. 27. Рост отдельных опухолей в трех группах в течение 29-дневного наблюдения после группирования (n=8).

Фиг. 28. Уменьшение массы опухоли на 29-й день после введения.

Фиг. 29. Средний объем опухоли в трех экспериментальных группах из дизайна эксперимента, показанного в табл. 7 ниже.

Фиг. 30. Средний объем опухоли в трех экспериментальных группах из дизайна эксперимента, показанного в табл. 7 ниже, на 21-й и 41-й день; три столбца для каждого дня соответствуют 1-й (слева), второй (в центре) и 3-й группе (справа).

Подробное описание изобретения

В следующем разделе аспекты настоящего изобретения дополнительно проиллюстрированы с помощью следующих примеров; однако, как должно быть понятно любому специалисту в данной области, приведенные ниже примеры предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. Все условия, которые не указаны в приведенных ниже примерах, должны соответствовать традиционно используемым или рекомендуемым производителем условиям. Все реагенты или приборы, производитель которых не указан, соответствуют стандартным изделиям, имеющимся в продаже.

Пример 1. Экспрессия рекомбинантных PD-L1 и PD-1 человека и получение соответствующих клеток EGFP.

Аминокислотная последовательность внеклеточного домена человеческого PD-L1 была получена на основании аминокислотной последовательности PD-L1 (Q9NZQ7), имеющейся в базе данных белков UniProt (т.е. последовательность от остатка 1 до остатка 238, содержащаяся в Q9NZQ7); аминокислотная последовательность структурного домена IgG1-Fc была получена на основании аминокислотной последовательности константной области человеческого иммуноглобулина гамма-1 (IgG1) (P01857), имеющейся в базе данных белков UniProt (т.е. последовательность от остатка 104 до остатка 330, содержащаяся в P01857); и аминокислотная последовательность структурного домена IgG1-Fc была получена на основании аминокислотной последовательности константной области человеческого иммуноглобулина гамма-1 (IgG1) (P01868), имеющейся в базе данных белков UniProt (т.е. последовательность от остатка 98 до остатка 324, содержащаяся в P01868). Для конструирования соответствующих кодирующих последовательностей ДНК для получения химерных генов hPD-L1-Fc и hPD-L1-muFc использовали онлайн-программу DNAsworks (<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>), и такой же метод использовали для получения гена hPD-1-Fc. Аминокислотная последовательность зеленого белка с усиленной флуоресценцией (EGFP) (C5MKY7), а также аминокислотная последовательность человеческого PD-L1 (Q9NZQ7), аминокислотная последовательность мышинового PD-L1 (Q9EP73) и аминокислотная последовательность человеческого PD-1 (Q15116) были получены на основании информации, содержащейся в базе данных белков UniProt. Для конструирования соответствующих кодирующих последовательностей ДНК для получения гена химерного белка hPD-L1-EGFP использовали онлайн-программу DNAsworks (<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>), и такой же метод использовали для получения генов hPD-1-EGFP и mPD-L1-EGFP. Соответствующие фрагменты ДНК были получены с помощью искусственного синтеза. Синтезированные последовательности генов подвергали двойному расщеплению ферментами HindIII и EcoRI производства компании Fermentas и клонировали в коммерческом векторе pcDNA4/myc-HisA (Invitrogen, V863-20), после чего проводили секвенирование для подтверждения правильного конструирования плазмиды с получением рекомбинантной плазмидной ДНК; т.е. pcDNA4-hPD-L1-Fc, pcDNA4-hPD-L1-muFc, pcDNA4-hPD1-Fc, pcDNA4-hPD1-EGFP, pcDNA4-hPD1-EGFP и pcDNA4-mPD-L1-EGFP.

Для амплификации генов человеческих белков PD-L2 и B7H3 из культивируемых в лаборатории дендритных клеток (клеток DC) (где указанные дендритные клетки были получены путем созревания мононуклеарных клеток, выделенных из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), в присутствии ФНО- α), использовали метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и следующие праймеры для амплификации генов:

PDL2-F HindIII: GCGCAAGCTTGCCACCATGATCTTCCTCCTGCTAATG (SEQ ID NO: 74),

PDL2-R EcoI:

GCCGAATTCGATAGCACTGTTCACTTCCCTC (SEQ ID NO: 75);

hB7H3-F HindIII: GCGCAAGCTTGCCACCATGCTGCGTCGGCGGGGCAGC (SEQ ID NO: 76);

hB7H3-R BamHI:

GCGCGAATTCGGCTATTTCTTGTCCATCATCTTC (SEQ ID NO: 77).

Затем полученный продукт ПЦР подвергали двойному расщеплению ферментами HindIII и EcoRI Fermentas и клонировали в ранее сконструированном векторе pcDNA4-hPD-L1-EGFP, после чего проводили секвенирование для подтверждения правильного конструирования плазмиды с получением рекомбинантной плазмидной ДНК; т.е. pcDNA4-hPD-L2-EGFP и pcDNA4-hB7H3-EGFP.

Соответствующей рекомбинантной плазмидой EGFP трансфицировали клетки HEK293 (ATCC, CRL-1573™), и через 48 ч после трансфекции проводили сортировку флуоресцентно активированных клеток (FACS) для подтверждения экспрессии hPD-L1, mPD-L1, hPD-L2 и hB7H3.

Клетки HEK293 транзитивно трансфицировали плазмидами pcDNA4-hPD-L1-Fc, pcDNA4-hPD-L1-muFc и pcDNA4-hPD1-Fc для продукции белка. Рекомбинантную экспрессионную плазмиду разводили питательной средой для культивирования клеток Freestyle293 и добавляли к раствору ПЭИ (полиэтиленimina), требующемуся для трансформации, после чего каждую смесь плазмиды/ПЭИ по отдельности добавляли к суспензии клеток и оставляли для культивирования при температуре 37°C, 10% CO₂ и 90 об/мин; в это же время готовили разведение 50 мкг/л инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) для добавления в культуру. Спустя четыре часа после этого в культуру добавляли питательную среду EX293, 2 ммоль/л глутамина и 50 мкг/л IGF-1, и культивирование продолжали при 135 об/мин. Еще через 24 ч добавляли 3,8 ммоль/л вальпроата натрия (VPA). После культивирования в течение 5-6 суток супернатант транзитивной экспрессионной культуры собирали, и для первоначальной очистки и получения образцов белков hPD-L1-Fc, hPD-L1-muFc и hPD-1-Fc, используемых в последующих примерах, применяли метод аффинной хроматографии с белком А. Полученные таким образом образцы белка предварительно исследовали методом электрофореза в ДСН-ПААГ, при этом были четко видны целевые полосы.

Пример 2. Скрининг антител к hPD-L1 в библиотеке дрожжевого дисплея 5, клонирование, экспрессия и идентификация.

Для скрининга полностью человеческих антител к PD-L1 использовали технологию дрожжевого дисплея. Для конструирования библиотеки дрожжевого дисплея scFv проводили клонирование генов VH и VL, содержащихся в κДНК IgM и IgG селезенки и лимфатических узлов, полученной от 21 здоровых добровольцев (линкерная последовательность между VH и VL представляла собой линкерный пептид

GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 67)

и линкерный пептид); емкость хранения библиотеки составляла 5×10^8 . Дрожжевую библиотеку 10-кратной емкости оживляли и индуцировали экспрессию антител на поверхности дрожжевых клеток. Для проведения двух раундов обогащения использовали 100 нмоль/л магнитных гранул с биотинилированным антигеном hPD-L1, после чего проводили два дополнительных раунда обогащения с использованием антитела к тус и проточной сортировки биотинилированных hPD-L1. Полученные таким образом дрожжи высевали на чашки и собирали отдельные клоны. Моноклональные дрожжи, которые подвергались амплификации и индукции экспрессии, дополнительно подвергали анализу окрашивания, используя антитело к тус, а также биотинилированный hPD-L1 или контрольный антиген hPD-1, и дрожжи с положительным результатом для антигена и отрицательным результатом для контроля оценивали как положительные.

Клоны дрожжей, подтвержденные с помощью FACS, подвергали ПЦР и секвенированию в отдельных колониях с использованием следующих праймеров для ПЦР:

pNL6-F:

GTACGAGCTAAAAGTACAGTG (SEQ ID NO: 78);

pNL6-R:

TAGATACCCATACGACGTTC (SEQ ID NO: 79);

при этом для секвенирования использовали праймер pNL6-R. Результаты определения последовательности после секвенирования подвергали анализу выравнивания, используя пакет программ BioEdit.

Ген одноцепочечного антитела scFv, полученный, как описано выше, и полученный ранее IgG1-Fc соединяли и клонировали в коммерческом векторе pEE6.4 (Lonza), используя двойное расщепление фер-

ментами HindIII и EcoRI компании Fermentas, после чего проводили клонирование и мини-препаративное выделение плазмиды в соответствии со стандартными методиками молекулярного клонирования. Проводили транзиторную экспрессию выделенных плазмид в клетках НЕК293 и очищали на колонке с белком А.

Клетки hPD-L1-EGFP ресуспендировали в 0,5% фосфатно-солевом буферном растворе с бычьим сывороточным альбумином (ФСБ-БСА), после чего добавляли указанные выше очищенные антитела scFv к hPD-L1 и одновременно ставили соответствующие контрольные эксперименты с 2 мкг белка hIgG1, используемого в качестве отрицательного контроля, а в качестве положительного контроля добавляли hPD-1-Fc. Вторым антителом было антитело к hIg-PE производства компании eBioscience. Детектирование проводили методом проточной цитометрии после завершения окрашивания. Описанный выше способ использовали для идентификации антител, способных к связыванию антигенов PD-L1 на поверхности клеток.

Клетки hPD-L1-EGFP ресуспендировали в 0,5% буферном растворе ФСБ-БСА, после чего добавляли указанные выше очищенные антитела scFv к hPD-L1, при этом одновременно ставили отрицательный контроль, в качестве которого использовали 2 мкг белка hIgG1; ко всем образцам добавляли 0,3 мкг hPD-1-Fc-биотин, и в качестве второго антитела использовали SA-PE производства компании eBioscience; детектирование проводили с помощью проточной цитометрии после завершения окрашивания, и результаты представлены на фиг. 1. Описанный выше способ использовали для идентификации антител, способных блокировать связывание антигенов PD-L1 и PD-1 на поверхности клеток.

После скрининга и идентификации было получено три штамма, экспрессирующих антитело, обладающих благоприятными характеристиками: B50, B60 и BII61. Как видно из результатов, все штаммы с антителом к hPD-L1 были способны блокировать связывание с рецептором hPD-1.

Последовательность линкерного пептида

GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 67)

находилась между вариабельными областями тяжелой цепи и легкой цепи указанного выше антитела.

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи B50 представляла собой:

QVQLQSQGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSTKAAWYWIRQSPSRGLEWLGRTYF
RSKQWYNDYADSVKSRILTINPDTSKNQFSLQLKSVSPEDTAVYYCARGQYTAFDIWGQG
TMVTVSS (SEQ ID NO: 51);

где подчеркнутые отрезки представляют собой CDR1, 2 и 3 и соответствуют SEQ ID NO: 13-15, соответственно, а неподчеркнутые отрезки представляют собой FR1, 2, 3 и 4 и соответствуют SEQ ID NO: 38-41, соответственно;

соответствующая последовательность ДНК представляла собой:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCT
CTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCACCAAGGCTGCTTGGTA
CTGGATCAGGCAGTCCCTTCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTTCCG
GTCCAAGTGGTATAATGACTATGCCGACTCTGTGAAAAGTCGATTAACCATCAACCC
AGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAATTAAGTCTGTGAGTCCCGAGGACAC
GGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGGGCAATACACTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGG
GACAATGGTCACCGTCTCTTCA (SEQ ID NO: 59);

аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи представляла собой:

QSALIQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYDLVSWYQQYYPGAPRLIIEYVIKRPS
GISDRF10 SGKSKGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYAGRRLHGVFGGGTQLTVL (SEQ
ID NO: 56);

где подчеркнутые отрезки представляют собой CDR1, 2 и 3 и соответствуют SEQ ID NO: 21, 17 и 18, соответственно, а неподчеркнутые отрезки представляют собой FR1, 2, 3 и 4 и соответствуют SEQ ID NO: 42-45, соответственно;

и соответствующая последовательность ДНК представляла собой:

CAGTCTGCTCTGATTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCCCCTGGACAGTCGATC
ACTATCTCCTGTAAGTGGCACCAGTAGTGATGTTGGAGGTTATGACCTTGTCTCCTGGT
ACCAACAGTACCCGGCCAAGCCCCAGACTCATCATTATGAGGTCATTAAGCGGCC
CTCAGGGATTCTGATCGCTTCTCTGGTTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGAC
AATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGCTGATTATTATGACGCTCATATGCAGGT
AGACGTCTTCATGGTGTGTTCCGGAGGAGGCCACCCAGCTGACCGTCCTC (SEQ ID NO:
66).

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи B60 представляла собой:

QVQLVQSGAEVKKPASSVKVSTASGGSFSTYAISSWVRQAPGQGLEWMGIIPIFG
TTKYAQRFRQGRVTITADESTTTAYMELSSLISDDTALYYCTTSRGSFYGWFDYWGQGT
LTVVSS (SEQ ID NO: 53);

где подчеркнутые отрезки представляют собой CDR1, 2 и 3 и соответствуют SEQ ID NO: 1, 2 и 19, соответственно, а неподчеркнутые отрезки представляют собой FR1, 2, 3 и 4 и соответствуют SEQ ID

NO: 22-25, соответственно;

соответствующая последовательность ДНК представляла собой:

CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGCGTCCCTCGGT
CAAAGTCTCCTGCACGGCTTCTGGCGGCTCCTTCAGCACCTATGCTATCAGTTGGGT
GCGACAGGCTCCTGGACAGGGCTTGAATGGATGGGCGGGATCATCCCCATCTTTGGT
ACAACТАAGTACGCACAGAGGTTCCAGGGCAGGGTCACGATTACCGCGGACGAATC
GACGACCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCTGATATCTGACGACACGGCCCTGTA
TTATTGTACGACGTCTCGTGGATTСAGСТАTGGCTGGTTTГACTACTGGGGCCAGGG
TACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 60);

аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи представляла собой:

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGIHLAWYQKLGQAPRLLIYGASSRAT
GIPDRFSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSLLPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:
48);

где подчеркнутые отрезки представляют собой CDR1, 2 и 3 и соответствуют SEQ ID NO: 4-6, соответственно, а неподчеркнутые отрезки представляют собой FR1, 2, 3 и 4 и соответствуют SEQ ID NO: 26-29, соответственно;

и соответствующая последовательность ДНК представляла собой:

GAAATTGTAATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGTAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCATACTTAGCCTGGTACCA
ACAGAAACTTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGTAGGGCCAC
TGGCATCCCAGACAGGTTСAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTCACTCTCACCATC
AGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTСAGCAGTATGGTTCTTTA
CCTCGGACGTTСGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO : 62).

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи В161 представляла собой:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSASWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKW
YDDYAVSVKSRISINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARSOGRYFVNYGMDVWQG
GTTVTVSS (SEQ ID NO: 54);

где подчеркнутые отрезки представляют собой CDR1, 20 и 3 и соответствуют SEQ ID NO: 7, 2 и 9, соответственно, а неподчеркнутые отрезки представляют собой FR1, 2, 3 и 4 и соответствуют SEQ ID NO: 30-33, соответственно;

соответствующая последовательность ДНК представляла собой:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTC
ACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTTCTTGGAACTG
GATCAGGCAGTCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATATTACAGGTC
CAAATGGTATGATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATCAGCATCAACCCAG
ACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGTGAACCTCTGTGACTCCCGAGGACACGGC
TGTGTATTACTGTGCAAGAAGCCAGGGACGATATTTGTCAACTACGGTATGGACGT
CTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO : 61);

аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи представляла собой:

DIRLTPSPSSLSASVGDRIITTCRASQSISSYLNWYQKPKGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQOQSYFTPRGITFGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 55);

где подчеркнутые отрезки представляют собой CDR1, 2 и 3 и соответствуют SEQ ID NO: 10-12, соответственно, а неподчеркнутые отрезки представляют собой FR1, 2, 3 и 4 и соответствуют SEQ ID NO: 34, 46, 36 и 37, соответственно;

и соответствующая последовательность ДНК представляла собой:

GACATCCGGTTGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA
ATCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGTTATTTAAATTGGTATCAA
CAGAAACCAGGGAAGCCСТАAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAGTTTGCAAAGT
GGGTCCCATCAAGGTTСAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
AGCAGTPTGCAACCTGAAGATGTTGCAACTACTGTCAACAGAGTTACTTTACCC
CCCGCGGATCACTTTCGGCCCTGGGACCAAGTGGATATCAAA (SEQ ID NO: 65).

Пример 3. Конструирование дрожжевой библиотеки scFv к hPD-L1 с улучшенной аффинностью.

Стандартную ПЦР соответственно проводили, используя плазмиды pEE6.4-B50-Fc, pEE6.4-B60-Fc и pEE6.4-B161-Fc в качестве матриц, и

pEE6.4-F:

TCTGGTGGTGGTGGTTCTGCTAGC (SEQ ID NO: 80) и

cMyc-BBXhoI:

GCCAGATCTCGAGCTATTACAAGTCTTCTTCAGAAATAAGCTTTTGTCTAGAAATCC
G (SEQ ID NO: 81)

в качестве праймеров. Продукты ПЦР очищали и клонировали в коммерческом векторе рСТ302 (производство компании Addgene: № 41845), используя NheI и BglII производства компании Fermentas, с получением рекомбинантных плазмид рСТ302-B50, рСТ302-B60 и рСТ302-ВП61. Затем использовали ПЦР, склонную к ошибкам, основываясь на способе, подробно описанном Гингер и соавт. (Ginger et al. (2006) Nat Protoc 1(2): 755-68), с получением продуктов ПЦР scFv со случайными мутациями. Использовали праймеры:

T7 proshort:

ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГ (SEQ ID NO: 82) и

Splice 4/L:

GGCAGCCCCATAAACACACAGTAT (SEQ ID NO: 83).

Полученные таким образом продукты ПЦР очищали, используя набор реагентов для очистки ДНК GeneJET компании Fermentas, а затем концентрировали путем осаждения этанолом до концентрации, превышающей 1 мкг/мкл. Для двойного расщепления коммерческого вектора рСТ302 использовали ферменты NheI и BamHI производства компании Fermentas, и в то же время для проведения дефосфорилирования вектора использовали фермент дефосфорилирования FastAP компании Fermentas, после чего для проведения очистки ДНК снова использовали набор реагентов GeneJET для очистки ДНК производства компании Fermentas и проводили осаждение этанолом для концентрирования продукта до концентрации более 1 мкг/мкл. Электротрансформацию дрожжей и рекомбинацию *in vivo* проводили в соответствии со способом, описанным Гингер с соавт. (Ginger et al. (2006) Nat. Protoc. 1(2): 755-68), с получением дрожжевой библиотеки с созреванием аффинности.

Пример 4. Скрининг дрожжей, экспрессирующих scFv к hPD-L1 с улучшенной аффинностью.

Дрожжевую библиотеку для созревания аффинности, полученную, как описано выше, подвергали двум раундам проточной сортировки, используя 10 нмоль/л и 1 нмоль/л белка hPD-L1-Fc, и полученные таким образом дрожжевые продукты высевали, после чего отбирали моноклоны для идентификации. Для проведения проточной цитометрии после окрашивания, чтобы идентифицировать дрожжевые моноклоны с повышенной аффинностью, использовали окрашивание антигеном в низкой концентрации и полученные ранее дрожжи дикого типа в качестве контроля.

Клоны дрожжей, подтвержденные с помощью FACS, подвергали ПЦР и секвенированию в отдельных колониях с использованием описанной выше методологии. Ген одноцепочечного антитела scFv, полученный после созревания аффинности, и полученный ранее IgG1-Fc соединяли и клонировали в коммерческом векторе pEE6.4, используя двойное расщепление ферментами HindIII и EcoRI компании Fermentas, после чего проводили клонирование и мини-препаративное выделение плазмиды в соответствии со стандартными методиками молекулярного клонирования. Проводили транзиторную экспрессию выделенных плазмид в клетках НЕК293 и очищали на колонке с белком А.

Связывающую способность и блокирующую способность антитела определяли количественно, используя способ, описанный в примере 2.

Результаты исследования связывающей способности см. на фиг. 2; результаты показывают, что три штамма, экспрессирующие антитело, полученные после созревания аффинности, обеспечивали значительно более высокую аффинность.

Результаты исследования блокирующей способности см. на фиг. 3; результаты показывают, что значения IC₅₀ для конкурентного связывания PD-L1 с PD-1, полученные для трех штаммов, экспрессирующих антитело, после созревания аффинности, составляли 0,837 мкг/мл для ВП61-62 (0,884 мкг/мл для ВП61), 4,56 мкг/мл для В50-6 (5,63 мкг/мл для В50) и 1,14 мкг/мл для В60-55 (16,8 мкг/мл для В60), соответственно.

После созревания аффинности были получены три последовательности антитела scFv к hPD-L1, проявляющие повышенную аффинность, т.е. В50-6, В60-55 и ВП61-62. По сравнению с В50 последовательность В50-6 содержит мутацию аминокислоты D на N в его VL CDR1; по сравнению с В60 последовательность В60-55 содержит мутацию аминокислоты S на N в его VH CDR3; и по сравнению с ВП61 последовательность ВП61-62 содержит мутацию аминокислоты S на G в его VH CDR2, а также мутацию аминокислоты I на V в его VL FR2. Последовательность линкерного пептида

GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 67)

находилась между переменными областями тяжелой цепи и легкой цепи указанного выше антитела.

Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи В50-6 представляла собой:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSTKAAWYWIRQSPSRGLEWLGRTYFRSKW
YNDYADSVKSRILTINPDTSKNQFSLQLKSVSPEDTAVYYCARGQYTAFDIWDGQGTMTV
VSS (SEQ ID NO: 51);

где подчеркнутые отрезки представляют собой CDR1, 2 и 3 и соответствуют SEQ ID NO: 13-15, со-

ответственно, а неподчеркнутые отрезки представляют собой FR1, 2, 3 и 4 и соответствуют SEQ ID NO: 38-41, соответственно;

соответствующая последовательность ДНК представляла собой:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTC
ACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCACCAAGGCTGCTTGGTACTG
GATCAGGCAGTCCCTTCGAGAGGCCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTTCCGGTC
CAAGTGGTATAATGACTATGCCGACTCTGTGAAAAGTCGATTAACCATCAACCCAG
ACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAATTAAGTCTGTGAGTCCCGAGGACACGGC
TGTGTATTACTGTGCAAGAGGGCAATACACTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGAC
AATGGTCACCGTCTCTTCA (SEQ ID NO: 59);

аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи представляла собой:

QSALIQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNVGGYDLVSWYQQYPGQAPRLIYEVIKRPS
GISDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYAGRRLHGVFGGGTQLTVL (SEQ ID
NO: 52);

где подчеркнутые отрезки представляют собой CDR1, 2 и 3 и соответствуют SEQ ID NO: 16-18, соответственно, а неподчеркнутые отрезки представляют собой FR1, 2, 3 и 4 и соответствуют SEQ ID NO: 42-45, соответственно;

соответствующая последовательность ДНК представляла собой:

CAGTCTGCTCTGATTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCCCCTGGACAGTCGATCACT
ATCTCCTGTAAGTGGACAGTAGTAATGTTGGAGGTTATGACCTTGTCTCCTGGTAC
CAACAGTACCCGGGCCAAGCCCCAGACTCATTTATGAGGTCATTAAGCGGGCC
TCAGGGATTCTGATCGCTTCTCTGGTTCCAAGTCTGGCACACGGCCTCCCTGACAA
TCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTATGCAGTCTATATGCAGGTA
GACGTCTTATGGTGTGTTCCGAGGAGGCACCCAGCTGACCGTCTC (SEQ ID NO:
64);

аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи B60-55 представляла собой:

QVQLVQSGAEVKKPASSVKVSTASGGSFSTYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFG
TTKYAQRFQGRVPTTAEDETTAYMELSSLISDDTALYYCTTSRGFNYGWFDYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 47);

где подчеркнутые отрезки представляют собой CDR1, 2 и 3 и соответствуют SEQ ID NO: 1-3, соответственно, а неподчеркнутые отрезки представляют собой FR1, 2, 3 и 4 и соответствуют SEQ ID NO: 22-25, соответственно;

соответствующая последовательность ДНК представляла собой:

CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGCGTCTCCTCGGT
CAAAGTCTCCTGCACGGCTTCTGGCGGCTCCTTCAGCACCTATGCTATCAGTTGGGT
GCGACAGGCTCCTGGACAGGGCTTGAATGGATGGGCGGGATCATCCCCATCTTTGGT
ACAATAAGTACGCACAGAGGTTCCAGGGCAGGGTCACGATTACCGCGGACGAATC
GACGACCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCTGATATCTGACGACACGGCCCTGTA
TTATTGTACGACGTCTCGTGGATTCAACTATGGCTGGTTTACTACTGGGGCCAGGG
TACCTGGTCAACCGTCTCTCTCA (SEQ ID NO: 57);

аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи представляла собой:

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGIHLAWYQKLGQAPRLLIYGASSRAT
GIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPRTFGQGTKEIK (SEQ ID
NO: 48);

где подчеркнутые отрезки представляют собой CDR1, 2 и 3 и соответствуют SEQ ID NO: 4-6, соответственно, а неподчеркнутые отрезки представляют собой FR1, 2, 3 и 4 и соответствуют SEQ ID NO: 26-29, соответственно;

соответствующая последовательность ДНК представляла собой:

GAAATTGTAATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGTAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCATACTTAGCCTGGTACCA
ACAGAAACTTGGCCAGGTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGTAGGGCCACT
GGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTACCATC
AGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGATTACTGTCAGCAGTATGGTTCTTTAC
CTCGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAAA (SEQ ID NO: 62);

аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи BII61-62 представляла собой:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSASWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYR
SKWYDDYAVSVKGRISINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARSQGRYFVNYGMDV
WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 49);

где подчеркнутые отрезки представляют собой CDR1, 2 и 3 и соответствуют SEQ ID NO: 7-9, соответственно, а неподчеркнутые отрезки представляют собой FR1, 2, 3 и 4 и соответствуют SEQ ID NO: 30-

33, соответственно;

соответствующая последовательность ДНК представляла собой:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCT
 CTCACCTGCTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGTCTCTGGAA
 CTGGATCAGGCAGTCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATATTACAG
 GTCCAAATGGTATGATGATTATGCAGTATCTGTGAAAGGTGCAATCAGCATCAACCC
 AGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGTGAACCTGTGACTCCCGAGGACAC
 GGCTGTGATTACTGTGCAAGAAGCCAGGGACGATATTTGTCAACTACGGTATGGA
 CGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 58);

аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи представляла собой:

DIRLQSPSSLSASVGDRIITTCRASQSISSYLNWYQKPKAPKLLVYGASSLQSGVPSR
 FSG SGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQSIFYTPRGITFGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 50);

где подчеркнутые отрезки представляют собой CDR1, 2 и 3 и соответствуют SEQ ID NO: 10-12, соответственно, а не подчеркнутые отрезки представляют собой FR1, 2, 3 и 4 и соответствуют SEQ ID NO: 34-37, соответственно;

и соответствующая последовательность ДНК представляла собой:

GACATCCGGTTGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA
 ATCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGTTATTAAATTGGTATCAA
 CAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGGTCTATGGTGCATCCAGTTTGAAAGT
 GGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACCATC
 AGCAGTCTGCAACCTGAAGATGTTGCAACTACTACTGTCAACAGAGTTACTTTACCC
 CCCGCGGGATCACTTTCCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA (SEQ ID NO: 63).

Пример 5. Перевод формата антитела из scFv в IgG.

Аминокислотная последовательность константной области человеческого IgG1 была получена на основании аминокислотной последовательности константной области человеческого иммуноглобулина гамма-1 (IgG1), имеющейся в базе данных белков Uniprot (P01857). Для конструирования соответствующих кодирующих последовательностей ДНК для получения гена константной области человеческого IgG1 использовали программу онлайн DNАworks (<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>), и последовательности VH варибельных областей тяжелой цепи B50-6, B60-55 и ВП61-61, полученные путем скрининга, подвергали совместному сплайсингу с геном константной области человеческого IgG1, одновременно присоединяя к 5' концу VH приведенную ниже последовательность сигнального пептида:

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCC
 ACCGGT (SEQ ID NO: 84);

сплайсированный ген синтезировали и проводили двойное расщепление, используя ферменты *Hind*III и *Eco*RI компании Fermentas для клонирования этого гена в векторе pEE6.4 с получением pEE6.4-B50-6HC; pEE6.4-B60-55HC; и pEE6.4-ВП61-62HC. Аминокислотная последовательность константной области человеческой легкой цепи каппа была получена на основании аминокислотной последовательности константной области легкой цепи каппа человеческого иммуноглобулина, имеющейся в базе данных белков Uniprot (P01834). Для конструирования соответствующих кодирующих последовательностей ДНК для получения гена константной области человеческой легкой цепи каппа использовали программу онлайн DNАworks (<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>), и последовательности VL варибельных областей легкой цепи B60-55 и ВП61-61, полученные путем скрининга, подвергали совместному сплайсингу с геном константной области человеческой легкой цепи каппа, одновременно присоединяя к 5' концу VL приведенную ниже последовательность сигнального пептида:

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACC
 GGT (SEQ ID NO: 84);

для конструирования соответствующих кодирующих последовательностей ДНК для получения гена константной области человеческой легкой цепи лямбда (κ) использовали программу онлайн DNАworks (<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>), и последовательность VL варибельной области легкой цепи B50-6, полученную путем скрининга, подвергали совместному сплайсингу с геном константной области человеческой легкой цепи лямбда, одновременно присоединяя к 5' концу VL приведенную ниже последовательность сигнального пептида:

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACC
 GGT (SEQ ID NO: 84);

и сплайсированный ген синтезировали и проводили двойное расщепление, используя ферменты *Hind*III и *Eco*RI компании Fermentas для клонирования этого гена в векторе pEE12.4 (Lonza) с получением pEE12.4-B50-6LC; pEE12.4-B60-55LC и pEE12.4-ВП61-62LC.

Препараты плазмид, содержащих тяжелую цепь и легкую цепь, полученных, как описано выше, готовили, используя набор реагентов AidLab Maxiprep Kit (PL14). Сконструированные рекомбинантные плазмиды, содержащие легкую и тяжелую цепь, совместно трансфицировали в клетки НЕК293 для экспрессии антитела. Рекомбинантную экспрессионную плазмиду разводили питательной средой для культивирования клеток Freestyle293 и добавляли к раствору ПЭИ (полиэтиленimina), требующемуся для

трансформации, после чего каждую смесь плазмиды/ПЭИ по отдельности добавляли к суспензии клеток и оставляли для культивирования при температуре 37°C, 10% CO₂ и 90 об/мин; в это же время в культуру дополнительно добавляли 50 мкг/л IGF-1. Спустя четыре часа после этого в культуру добавляли питательную среду EX293, 2 ммоль/л глутамин и 50 мкг/л IGF-1, и культивирование продолжали при 135 об/мин. Еще через 24 ч добавляли 3,8 ммоль/л VPA. После культивирования в течение 5-6 суток супернатант транзитной экспрессионной культуры собирали и для очистки и получения антител к hPD-L1 мАт В50-6, В60-55 и ВП61-62, применяли метод аффинной хроматографии с белком А.

Аминокислотная последовательность константной области цепи IgG1 представляла собой:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIKTISKAKGQPREPVYTLPL
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 68);

последовательность нуклеиновой кислоты константной области цепи IgG1 представляла собой:

GCCAGCACTAAGGGGCCCTCTGTGTTTCCACTCGCCCCTTCTAGCAAAAGCACT
TCCGGAGGCACTGCAGCACTCGGGTGTCTGGTCAAAGATTATTTCCCTGAGCCAGTC
ACCGTGAGCTGGAACCTGGCGCCCTCACCTCCGGGGTTCACACCTTCCAGCCGTCC
TGCAGTCCCTCCGGCCTGTACTCCCTGAGCAGCGTTCGTTACCGTGCCATCCTCTCTCT
GGGGACCCAGACATACATCTGCAATGTCACCATAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGA
CAAAAAGGTGCGAGCCAAAGAGCTGCGATAAGACACACACCTGCCCTCCATGCCCCG
CACCTGAACCTCTGGCGGGCCTCCGTTTCTCTGTTTCCCTCAAGCCCAAGGATAC
ACTGATGATTAGCCGCACCCCGAAGTCACTTGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCATGA
AGATCCAGAAGTTAAGTTAACTGGTATGTGGACGGGTGCGAGGTGCACAATGCTA
AACAAAGCCCAGGGAGGAGCAATATAACTCCACATACAGAGTGGTGTCCGTTCTGA
CAGTCCCTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAATACAAGTGCAAGGTGTCTAAT
AAGGCACTGCCAGCCCCATAGAGAAGACAATCTCTAAAGCTAAAGGCCAAACACGC
GAGCCTCAGTCTACACACTGCCACCATCCAGGGACGAACCTGACCAAGAATCAGGT
GAGCCTGAGTGTCTCGTCAAAGGATTCTACCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
ATCCAACGGCCAACAGAGAACAACACTACAAGACCACCCACAGTCTGGACTCTG
ATGGGAGCTTTTCTGTTTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCTCGTGGCAACAGGG
CAACGTGTTACAGTGTCTCCGTGATGCATGAAGCCCTGCATAACCACTATACCCAGAA
AAGCCTCAGCCTGTCCCCCGGGAATAATGA (SEQ ID NO: 69);

аминокислотная последовательность константной области цепи каппа представляла собой:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 70);

последовательность нуклеиновой кислоты константной области цепи каппа представляла собой:

CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG
AAATCTGGTACCGCTAGCGTTGTGTGCCTGTGAATAACTTTTATCCACGGGAGGCT
AAGGTGCAGTGGAAAGGGACAATGCCCTCCAGAGCGGAAATAGCCAAGAGTCCGTT
ACCGAACAGGACTCTAAAGACTCTACATACTCCCTGTCTCCACACTGACCCCTCTCC
AAGGCCGACTATGAGAAACACAAGGTTTACCATGCGAGGTACACACCAGGGACTC
TCTCTCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGAGAATGC (SEQ ID NO: 71);

аминокислотная последовательность константной области легкой цепи (лямбда) В50-6 представляла собой:

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGA VTVAWKADGSPVKVGVETTKPS
KQSNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAEC (SEQ ID NO: 72);

и последовательность нуклеиновой кислоты константной области легкой цепи (лямбда) В50-6 представляла собой:

GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCACCTCCTCTGAGGAG
CTTCAAGCCACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCGTAAGTGA CTCTACCCGGGAGCC
GTGACAGTGGCCTGGAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGTGGGAGTGGAGACCACC
AAACCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTATGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGAC
GCCCGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTACGCTGCCGGGTACGCATGAAGGGAG
CACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTGCAGAATGCTCT (SEQ ID NO: 73).

Пример 6. Подтверждение свойств мАт по отношению к hPD-L1.

Количественное определение способности очищенного антитела к связыванию с hPD-L1 и hPD-L1 (метод тИФА).

Для разведения hPD-L1-муFc до 2 мкг/мл использовали покрывающий буферный раствор (50 ммоль/л карбонат-бикарбонатного буферного раствора, pH 9,6), после чего раствор распределяли аликвотами из расчета по 100 мкл в одну лунку и оставляли без перемешивания на ночь при температуре 4°C.

Затем жидкость с планшета сливали и проводили его промывание, используя ФСБ-Т (рН 7,4, 0,05% Твина-20, об./об.) и блокировали образец в ФСБ с 3% БСА в течение 1 ч. Каждое из мАт В50-6, В60-55 и ВП61-62 подвергали двукратному серийному разведению, начиная с 2000 нг/мл, с получением суммарно 11 различных концентраций, при этом разбавитель (ФСБ с 1% БСА) использовали в качестве контроля, и проводили инкубацию в течение 2 ч при температуре 37°C. Затем добавляли козий античеловеческий IgG-HRP (козий античеловеческий IgG, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP)) и проводили инкубацию в течение 1 ч. Затем добавляли раствор растворимого однокомпонентного хромогенного субстрата триметилбензидина (ТМБ), и каждый образец проявляли при комнатной температуре в темноте в течение 5-10 мин. Для остановки реакции проявления добавляли 50 мкл/лунка 2н. раствора H₂SO₄. Затем каждый образец помещали в ридер для микропланшетов MD SpectraMax Plus384 и регистрировали показания OD при 450-650 нм, после чего для обработки данных и анализа картирования использовали пакет программ SoftMax Pro v5.4; результаты показаны на фиг. 4.

Используя описанный выше способ, определили, что значения EC₅₀ (полумаксимальная эффективная концентрация) связывания антигена для трех штаммов, экспрессирующих антитело, составляют 40 мкг/мл (мАт В60-55), 18,3 мкг/мл (мАт ВП61-62) и 28,1 мкг/мл (мАт В50-6).

Количественное определение показателей кинетики связывания очищенного антитела к hPD-L1 и hPD-L1 (SPR).

Количественное определение показателей кинетики связывания антител к PD-L1 мАт В50-6, мАт ВП61-62 и мАт В60-55 по отношению к рекомбинантному человеческому PD-L1 проводили методом поверхностного плазмонного резонанса (SRP), используя Biacore X100. Рекомбинантный hPD-L1-Fc непосредственно наносили в качестве покрытия на биосенсорный микрочип CM5 с целью получения приблизительно 1000 единиц отклика (response units, RU). Для измерения показателей кинетики проводили трехкратное серийное разведение антитела в 1-кратном буферном растворе HBS-EP+ (GE, № по каталогу: BR-1006-69) (от 1,37 нм до 1000 нм), отбор образцов проводили при температуре 25°C в течение 120 с, при этом время диссоциации составляло 30 мин, и проводили регенерацию раствором с 10 ммоль/л глицина HCl (рН 2,0) в течение 120 с. Для расчета скорости ассоциации (kon) и скорости диссоциации (koff) использовали простую модель связывания Лангмюра один к одному (программа Biacore Evaluation версия 3.2). Равновесные константы диссоциации (KD) рассчитывали с помощью компьютера как отношение koff/kon.

Измеренные значения аффинности связывания антитела к PD-L1 см. в табл. 1.

Таблица 1

Количественное определение показателей кинетики связывания антитела к hPD-L1 и hPD-L1

Обозначение	Kon (1/мс)	Koff (1/с)	KD (M)
мАт В50-6	1,672E+5	1,370E-2	8,193E-8
мАт В60-55	1,295E+6	2,222E-4	1,716E-10
мАт ВП 61-62	9,795E+4	4,264E-4	4,353E-9

Количественное определение связывающей способности очищенного антитела к hPD-L1 с hPD-L1 в конкуренции с hPD-L1.

Для разведения hPD-L1-hIgG до 5 мкг/мл использовали покрывающий буферный раствор (50 ммоль/л карбонат-бикарбонатного буферного раствора, рН 9,6), после чего раствор оставляли без перемешивания на ночь при температуре 4°C. Промывание проводили, используя ФСБ-Т (рН 7,4, 0,05% Твина-20, об./об.) и блокировали образец в ФСБ с 3% БСА в течение 1 ч. Концентрацию мАт к hPD-L1 в ожидании измерения доводили до 100 мкг/мл, после чего проводили серийное разведение 1:6, используя ФСБ-Т с 1% БСА - 0,05% Твина-20 (содержащий 10 мкг/мл hPD-L1-hIgG-биотина), с получением суммарно 9 различных разведений, и растворы оставляли без перемешивания на 2 ч при температуре 37°C. После промывания планшета добавляли стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (SA-HRP), и образец оставляли для инкубации при комнатной температуре на 1,5 ч. Затем добавляли раствор растворимого однокомпонентного хромогенного субстрата триметилбензидина (ТМБ), и каждый образец проявляли при комнатной температуре в темноте в течение 5-10 мин, после чего добавляли 2н. раствора H₂SO₄ для остановки реакции проявления. Затем каждый образец помещали в ридер для микропланшетов MD SpectraMax Plus384 и регистрировали показания OD при 450-650 нм, после чего для обработки данных и анализа картирования использовали пакет программ SoftMax Pro v5.4; на основании данных измерения проводили анализ конкурентоспособности антитела, и значения IC₅₀ и результаты показаны на фиг. 5.

Используя описанный выше способ, определили, что значения IC₅₀ конкурентного связывания с антигеном для PD-L1 по отношению к PD-L1 у трех штаммов, экспрессирующих антитело, составляют 0,255 мкг/мл, 1,7 нмоль/л (В60-55), 0,24 мкг/мл, 1,6 нмоль/л (ВП61-62) и 1,76 мкг/мл, 11,7 нмоль/л (В50-6).

Количественное определение связывающей способности очищенного антитела к hPD-L1 с hPD-L1 в конкуренции с CD80.

Методом конкурентного ТИФА проводили оценку трех штаммов, полученных в результате скрининга, В60-55, ВП61-62 и В50-6, чтобы определить, способны ли они к блокированию связывания PD-L1

и CD80. Для этого использовали следующий специфический способ: разведение hPD-L1-hFc до 5 мкг/мл проводили покрывающим буферным раствором (50 ммоль/л карбонат-бикарбонатного буферного раствора, pH 9,6), после чего раствор оставляли без перемешивания на ночь при температуре 4°C. Промывание проводили, используя ФСБ-Т (pH 7,4, 0,05% Твина-20, об./об.) и блокировали образец в ФСБ с 3% БСА в течение 1 ч. Концентрацию мАт к hPD-L1 в ожидании измерения доводили до 100 мкг/мл, после чего проводили серийное разведение 1:6, используя ФСБ-Т с 1% БСА - 0,05% Твина-20 (содержащий 100 мкг/мл hCD80-hFc-биотин, R&D: 140-B1-100), с получением суммарно 9 различных разведений, и растворы оставляли без перемешивания на 2 ч при температуре 37°C. После промывания планшета добавляли стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (SA-HRP), и образец оставляли для инкубации при комнатной температуре на 1,5 ч. Затем добавляли раствор растворимого однокомпонентного хромогенного субстрата триметилбензидина (ТМБ), и каждый образец проявляли при комнатной температуре в темноте в течение 5-10 мин, после чего добавляли 2н. раствор H₂SO₄ для остановки реакции проявления. Затем каждый образец помещали в ридер для микропланшетов MD SpectraMax Plus384 и регистрировали показания OD при 450-650 нм, после чего для обработки данных и анализа картирования использовали пакет программ SoftMax Pro v5.4; на основании данных измерения проводили анализ конкурентоспособности антитела, и значения IC₅₀ и результаты показаны на фиг. 6.

Используя описанный выше способ, определили, что значения IC₅₀ конкурентного связывания с антигеном для PD-L1 по отношению к CD80 для трех штаммов, экспрессирующих антитело, составляют 0,543 мкг/мл (B60-55), 0,709 мкг/мл (ВП61-62) и 0,553 мкг/мл, 11,7 нмоль/л (B50-6).

Подтверждение наличия или отсутствия специфичности распознавания PD-L1: связывание очищенного антитела к hPD-L1 с hPD-L1, hPD-L2 и hB7H3.

Клетки НЕК293, содержащие hPD-L1-EGFP, hB7H3-EGFP и hPD-L2-EGFP, которые были сконструированы в примере 1, суспендировали в ФСБ с 0,5% БСА, после чего добавляли белок мАт к hPD-L1 (с использованием Fc hIgG в качестве отрицательного контроля) и проводили инкубацию на льду в течение 20 мин. После промывания добавляли второе антитело компании eBioscience к hIg-PE, и образцы оставляли без перемешивания на льду в течение 20 мин. После промывания клетки ресуспендировали в 500 мкл ФСБ с 0,5% БСА и проводили измерение в проточном цитометре.

Результаты представлены на фиг. 6. Как показывают результаты, все три штамма, экспрессирующих антитело, способны к связыванию с клетками hPD-L1-EGFP, но неспособны к связыванию с клетками hB7H3-EGFP и hPD-L2-EGFP, что свидетельствует о высокой специфичности.

Связывание очищенного антитела к hPD-L1 с мышинным PD-L1 (mPD-L1).

Клетки НЕК293, содержащие hPD-L1-EGFP и mPD-L1-EGFP, которые были сконструированы в примере 1, суспендировали в ФСБ с 0,5% БСА, после чего добавляли целевое мАт к hPD-L1 (с использованием Fc hIgG в качестве отрицательного контроля) и проводили инкубацию на льду в течение 20 мин; затем проводили промывание и добавляли второе антитело к hIg-PE компании eBioscience, и образцы оставляли без перемешивания на льду на 20 мин. После промывания клетки ресуспендировали в ФСБ с 0,5% БСА и проводили измерение в проточном цитометре. Результаты представлены на фиг. 7. Как показывают результаты, мАт B50-6 было способно к связыванию с мышинным PD-L1 (mPD-L1), при этом антитела B60-55 и ВП61-62 не обладали способностью к связыванию с mPD-L1.

Связывание очищенного антитела к hPD-L1 с PD-L1 яванского макака.

МКПК яванского макака выделяли с помощью среды для разделения лимфоцитов человека (Tianjin Hao Yang) и клетки ресуспендировали в полной питательной среде RPMI, после чего плотность клеток доводили до 1 миллиона клеток/мл; после этого вносили 2 миллиона МКПК яванского макака в 24-луночный планшет, одновременно добавляя фитогемагглютинин (ФГА) до конечной концентрации 2 мкг/мл; клетки стимулировали в течение 48 ч, после чего их собирали, промывали буфером для FACS и окрашивали для определения антитела. В качестве отрицательного контроля использовали контроль изотипа (антитело к гемоцианину лимфы улитки), а в качестве положительного контроля использовали PE-меченные антитела к человеческому PD-L1 (Biolegend: 329705). Используя в качестве первых антител антитела, полученные в лаборатории, проводили окрашивание антитела, используя в качестве второго антитела антитело к hIg-PE после промывания. После каждой стадии окрашивания следовала инкубация при температуре 4°C в течение тридцати минут, и после выполнения окрашивания клетки дважды промывали буферным раствором для FACS путем центрифугирования, после чего добавляли вторые антитела либо клетки фиксировали непосредственно в 2% растворе формальдегида с последующим анализом с использованием Guava. Результаты представлены на фиг. 8. Результаты показали, что Т-лимфоциты яванского макака экспрессировали PD-L1 после стимуляции ФГА, а три штамма, экспрессирующих полученные антитела, обладали способностью к связыванию с активированными Т-лимфоцитами яванского макака.

Пример 7. Количественная оценка активации CD4+ Т-лимфоцитов антителом к PD-L1 в реакции в смеси дендритных клеток и Т-лимфоцитов.

Для выделения мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) из обогащенных периферических лимфоцитов, полученных от здоровых доноров, центрифугированием в градиенте плотности использовали среду для разделения лимфоцитов человека (Tianjin Hao Yang). Затем указанные клетки

ресуспендировали в питательной среде RPMI1640 без сыворотки крови и культивировали в чашке Петри диаметром 10 см в течение 1-2 ч, после чего неприкрепившиеся клетки удаляли, и клетки культивировали в питательной среде RPMI, содержащей 10% ФБС (фетальной бычьей сыворотки). Цитокины добавляли в конечной концентрации 250 нг/мл для GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагального колоннестимулирующего фактора; Shanghai Primegene: 102-03) и 100 нг/мл для интерлейкина (ИЛ)-4 (Shanghai Primegene: 101-04), а затем свежую среду, содержащую цитокины, добавляли один раз в 2-3 дня. На 6-й день культивирования для индукции созревания клеток использовали 50 нг/мл ФНО-альфа (Shanghai Primegene: 103-01) и клетки инкубировали еще в течение 24 ч. Зрелые дендритные клетки собирали и окрашивали антителом к HLA-DR для подтверждения созревания. Затем клетки ресуспендировали в полной среде RPMI в концентрации 200 000 клеток/мл. В каждую лунку 96-лучночного планшета с U-образным дном вносили 50 мкл полученной в результате суспензии (Costar: 3799), и клетки оставляли для культивирования в инкубаторе.

Для выделения CD4+ Т-лимфоцитов из МКПК, полученных от другого донора в соответствии с прилагаемыми инструкциями, использовали набор реагентов для выделения на магнитных гранулах (Miltenyi Biotec: 130-096-533). Клетки считали и ресуспендировали в полной среде RPMI в концентрации 2 миллиона клеток/мл, после чего их вносили в лунки 96-лучночного планшета с U-образным дном, содержащие дендритные клетки, по 50 мкл в каждую лунку. В каждую лунку добавляли по 100 мкл антител к PD-L1, серийно разведенных в полной среде RPMI до получения конечных концентраций антитела 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 и 0 мкг/мл. Затем клетки культивировали в течение пяти дней, супернатант отбирали и для определения содержания IFN- γ в супернатанте использовали набор реагентов для тИФА IFN- γ (eBioscience). Результаты представлены на фиг. 9. Результаты показывают, что антитела к PD-L1 могут усиливать секрецию γ -IFN CD4+ Т-лимфоцитами в смешанной реакции лимфоцитов; то есть антитела к PD-L1 усиливают активацию Т-лимфоцитов. Значение EC₅₀, полученное для ВП61-62, составляло 0,078 мкг/мл (эквивалентно 0,5 нМ), и значение EC₅₀, полученное для В60-55, составляла 0,189 мкг/мл (эквивалентно 1,2 нмоль/л).

Пример 8. Ингибиторная активность антитела к hPD-L1 в отношении роста опухоли.

Уже ясно, что многие опухоли экспрессируют лиганды PD-1, поэтому противоопухолевые ответы Т-лимфоцитов ослабляются. У множества различных пациентов было обнаружено характерное повышение уровня экспрессии лиганда PD-L1 и инфильтрирующих в опухоль лимфоцитов, и повышенный уровень экспрессии PD-L1 часто сопровождался неблагоприятным прогнозом. В моделях опухолей у мышей также показано подобное повышение экспрессии PD-L1 в опухолях, а также показана роль пути PD-1/PD-L1 в ингибировании противоопухолевого иммунитета.

В данном изобретении получены экспериментальные результаты, показывающие, что блокирование PD-L1 влияет на рост опухоли из клеток MC38 (клетки колоректального рака мыши), обнаруженной у изогенных мышей линии C57B6.

В день 0 1 миллион клеток MC38 (любезно предоставленных профессором Янгксином Фу (Yangxin Fu) из Университета Чикаго) инокулировали подкожно мышам линии C57B6; затем в дни 0, 3, 7 и 10 мышам проводили интраперитонеальную инъекцию 10 мг/кг антитела к PD-L1 (B50-6) или ФСБ. В день 3 измеряли размеры опухоли и рассчитывали объем опухоли для построения кривой роста опухоли (см. фиг. 10); результаты показывают, что антитело к PD-L1 (B50-6) способно к значительному ингибированию роста опухоли.

Для исследования активности антител к PD-L1 В60-55 и ВП61-62 *in vivo* использовали линию мышей NOD/SCID (с сахарным диабетом, без ожирения/тяжелым комбинированным иммунодефицитом), неспособную к распознаванию мышинового PD-L1. В экспериментах использовали линию клеток меланомы A375 (ATCC, CRL-1619TM), экспрессирующую PD-L1 человека, которую трансплантировали подкожно мышам линии NOD/SCID, и для достижения указанной выше цели использовали мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека. Перед введением клетки A375 и МКПК смешивали в соотношении 5:1 и проводили подкожную инъекцию в общем объеме 100 мкл (содержащем 5 миллионов клеток A375 и 1 миллион МКПК); антитела вводили интраперитонеально в дни 0, 7, 14, 21 и 28 после инокуляции опухоли (на фиг. 11-А показана доза антитела, составляющая 3 мг/кг, а дозы антитела для фиг. 11-В непосредственно показаны на фиг. 11) и в качестве отрицательного контроля вводили ФСБ. Каждая экспериментальная группа состояла из 4-6 мышей. За образованием опухоли наблюдали два раза в неделю, размеры измеряли с помощью штангенциркуля Верньера и рассчитывали объем опухоли для построения кривой роста опухоли (см. фиг. 11); результаты показывают, что антитела В60-55 и ВП-61-62 способны к значительному ингибированию роста опухоли.

Пример 9. Сравнение стабильности В60-55 и антитела 2.41Н90Р (Medimmune).

Ускоренное исследование стабильности антитела к PD-L1 В60-55 и антитела 2.41Н90Р производства компании Medimmune LLC проводили при температуре 45°C с использованием описанной ниже специфической методики исследования: антитело к PD-L1 В60-55 и антитело к PD-L1 2.41Н90Р производства компании Medimmune LLC (полученное в соответствии со способом получения 2.14Н9, описанным в патенте США № 20130034559, после чего антителу было присвоено другое название - 2.41Н90Р) обога-

шали до концентрации 10 мг/мл, после чего 100 мкг антитела добавляли в пробирку для ПЦР вместимостью 200 мкг и помещали в условия испытания серии при температуре 45°C; образцы брали в дни 0, 10, 20 и 30 и проводили исследования методами конкурентной тИФА и эксклюзионной ВЭЖХ, где используемая методика конкурентной тИФА была такой же, как описано в примере 6, с получением значений IC_{50} . Эксклюзионную ВЭЖХ проводили с помощью хроматографа Shimadzu LC LC20AT для ВЭЖХ; образцы концентрировали до 1 мг/мл и загружали образцы при скорости потока 0,5 мл/мин, при этом общий объем образца составлял 50 мкл; через 30 мин после загрузки образца проводили изократическое элюирование, и результаты представлены на фиг. 12.

На фиг. 12, А показано графическое сравнение значений IC_{50} в зависимости от времени для В60-55 и антитела 2.41Н90Р, и полученные данные показывают отсутствие значимых изменений конкурентоспособности образца в различные моменты времени; на панели В показана доля димеров антитела в зависимости от времени, и данные показывают, что доля димеров со временем уменьшается для обоих антител, В60-55 и 2.41Н90Р; однако выявленная скорость, с которой она уменьшалась, для 2.41Н90Р была больше, чем для В60-55, что указывает на более высокую стабильность В60-55; и на панели С показана кривая конкурентного тИФА, полученная для ускоренного исследования стабильности В60-55, и показано, что В60-55 способно к сохранению относительно высокой активности и стабильности.

Пример 10. Масштабирование производства и стабильности препарата варианта В60-55-1 антитела.

Чтобы оценить возможность получения антитела в большем масштабе, пример варианта антитела В60-55-1 был клонирован по существу в соответствии с приведенным выше описанием. Аминокислотная последовательность полноразмерной тяжелой цепи В60-55-1 представляла собой:

```

QVQLVQSGAEVKKPASSVKVSTASGGSFSTYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFG
TTKYAQRFRQGRVTITADESTTTAYMELSSLDLALYYCTTSRGNFYGWFDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

```

(SEQ ID NO: 85);

соответствующая последовательность ДНК представляла собой:

```

CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGCGTCCTCGGTCAA
AGTCTCCTGCACGGCTTCTGGCGGCTCCTTCAGCACCTATGCTATCAGTTGGGTGCG
ACAGGCTCCTGGACAAGGGCTTGAATGGATGGGCGGGATCATCCCCATCTTTGGTAC
AACTAAGTACGCACAGAGGTTCCAGGGCAGGGTCACGATTACCGCGGACGAATCGA
CGACCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGATATCTGACGACACGGCCCTGTATT
ATTGTACGACGTCTCGTGGATTCAACTATGGCTGGTTTGACTACTGGGGCCAGGGTA
CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCAGCACTAAGGGGCCCTCTGTGTTTCCACTCGCCC
CTTCTAGCAAAAAGCACTTCCGGAGGCACTGCAGCACTCGGGTGTCTGGTCAAAGATT
ATTTCCCTGAGCCAGTCACCGTGAGCTGGAACCTCTGGCGCCCTCACCTCCGGGGTTC
ACACCTTTCCAGCCGTCCTGCAGTCTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGAGCAGCGTCTGTA
CCGTGCCATCCTCTTCTCTGGGGACCCAGACATACATCTGCAATGTCAACCATAAGC
STAGCAACACCAAGGTGGACAAAAGGTCGAGCCAAAGAGCTGCGATAAGACACA
CACCTGCCCTCCATGCCCCGCACCTGAACTCCTGGGCGGGCCCTCCCGTTTCTCTGTTT
CCTCCCAAGCCCAAGGATACACTGATGATTAGCCGCACCCCGAAGTCACTTGCCTG
GTGGTGGATGTGAGCCATGAAGATCCAGAAGTTAAGTTAACTGGTATGTGGACGG
GGTCGAGGTGCACAATGCTAAAACAAAGCCAGGGAGGAGCAATATGCCTCCACAT
ACAGAGTGGTGTCCGTTCTGACAGTCTTCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAA
TACAAGTGCAAGGTGTCTAATAAGGCACTGCCAGCCCCATAGAGAAGACAATCTC
TAAAGCTAAAGGCCAACCACGCGAGCCTCAGGTCTACACACTGCCACCATCCAGGG
AGGAAATGACCAAGAATCAGGTGAGCCTGACTTGTCTCGTCAAAGGATTCTACCCA
AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAATCCAACGGCCAACCAGAGAACAACATAAGA
CCACCCACCAGTCTGACTCTGATGGGAGCTTTTCTCTGATTCCAAGCTGACAG
TGGACAAGTCTCGGTGGCAACAGGGCAACGTGTTCAGCTGCTCCGTGATGCATGAA
GCCCTGCATAACCACTATACCCAGAAAAGCCTCAGCCTGTCCCCCGGGAATAATG
A

```

(SEQ ID NO: 86);

аминокислотная последовательность полноразмерной легкой цепи представляла собой:

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGIHLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD
RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPLRPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 87);

соответствующая последовательность ДНК представляла собой:

GAAATTGTAATGACACAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC
ACCCTCTCCTGTAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCATACTTAGCCTGGTATCAACAG
AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGTAGGGCCACTGGC
ATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC
AGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTTCTTTACCT
CGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATC
TGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGTACCGCTAGCGTTGTG
TGCCTGCTGAATAACTTTTATCCACGGGAGGCTAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAA
TGCCCTCCAGAGCGGAAATAGCCAAGAGTCCGTTACCGAACAGGACTCTAAAGACT
CTACATACTCCCTGTCTCCACACTGACCCTCTCCAAGGCCGACTATGAGAAACACA
AGGTTTACGCATGCGAGGTCACACACCAGGGACTCTCTCTCCCGTGACCAAGAGCT
TCAACCGGGGAGAATGC

(SEQ ID NO: 88);

В60-55-1 получали в клетках CHO, выращенных в биореакторе с использованием питательной среды ActiCHO (GE) или Dynamis (Thermo Fisher Scientific). Сначала В60-55-1 очищали из осветленной культуральной жидкости клеток с помощью аффинной хроматографии с белком А на смоле MabSelect Sure LX, GE, после чего проводили две следующие стадии хроматографии - анионообменную хроматографию на Q-адсорбирующей (GE) мембране в проточном режиме и колоночную хроматографию на гидроксипатитной смоле (CaPure-NA, Tosoh), которая была последней стадией очистки.

Наблюдаемый выход стадии очистки В60-55-1 на смоле с белком А составлял около 95-98%. Наблюдаемый выход хроматографии на Q-адсорбенте составлял около 93-95%. Стадия конечной очистки В60-55-1, на которой происходит удаление димеров, олигомеров и агрегатов В60-55-1, следовых количеств остаточной ДНК и белка А, выходящего из колонки с белком А, представляет собой заключительную хроматографическую очистку на CaPure-NA, которая также служит в качестве надлежащей стадии очистки от вирусов. Выход конечной стадии очистки на гидроксипатите составлял 77-85%. Хроматограмма очистки В60-55-1 на CaPure-NA показана на фиг. 14.

Однородность В60-55-1 после хроматографии на CaPure-NA, оцениваемая с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, была не ниже 99%. Аналитическая эксклюзионная хроматограмма представлена на фиг. 15.

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии ДСН (ДСН-ПААГ) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях также продемонстрировал высокую чистоту препарата В60-55-1. Изображения гелей, окрашенных кумасси, представлены на фиг. 16.

Триптическое пептидное картирование очищенного В60-55-1 методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ-МС) показало, что в тяжелой цепи очищенного антитела отсутствует С-концевой остаток лизина, что не повлияло на антигенсвязывающие свойства очищенного антитела (см. пример 11).

Несколько жидких препаратов, разработанных для В60-55-1, оценили в исследованиях стабильности в стрессовых условиях. В ходе этих исследований стерильные образцы различных препаратов В60-55-1 с концентрацией В60-55-1 около 50 мг/мл инкубировали при температуре 40°C в течение 6 недель. Образцы объединяли и проводили анализ в семь моментов времени в течение инкубации: 0, 1, 2, 3, 4, 5 и 6 недель. Последующее испытание объединенных образцов проводили путем измерения концентрации белка (концентрация В60-55-1), определения чистоты, целостности, мутности и осмоляльности. Концентрацию белка измеряли на основании оптической плотности раствора при 280 нм, подлинность и целостность белка определяли методом электрофореза в ДСН-ПААГ, мутность определяли на основании оптической плотности A_{600} , осмоляльность измеряли с помощью калиброванного осмометра. На основании результатов экспериментов по исследованию стабильности в стрессовых условиях для последующих исследований был использован препарат, содержащий 275 ммоль/л серина, 10 ммоль/л гистидина, pH 5,9. В этом препарате после инкубации при температуре 40°C в течение 5 недель чистота В60-55-1 превышала 95%. Дополнительно по существу аналогичные результаты исследования стабильности белка были получены для препарата, содержащего 0,05% полисорбата 80, 1% D-маннитола, 120 ммоль/л L-пролина, 100 ммоль/л L-серина, 10 ммоль/л L-гистидина HCl, pH 5,8.

Пример 11. Исследования кинетики связывания очищенного антитела В60-55-1 и hPD-L1 методом SPR.

Цель исследования состояла в сравнительной оценке параметров связывания В60-55-1 по сравнению с атезолизумабом при взаимодействии с PD-L1 методом SPR. Анализ проводили, используя несколько подходов и два варианта человеческого PD-L1, PD-L1-His-метка и химерный белок PD-L1-Fc.

Для расчета констант диссоциации (Kd) использовали серию различных концентраций лиганда PD-L1. Использовали следующее оборудование: плазмонно-резонансный спектрометр R75000DC, Reichert Technologies, прибор № 00478-1115 с пакетами программ SPRAutolink Control и TraceDrawer; сенсорный микрочип SR7000 Gold Sensor Slide, карбоксиметилдекстран, 500 кДа, Reichert, Inc, №: 13206066.

Использовали следующие реагенты: исходный раствор B60-55-1 с концентрацией 32 мг/мл в 1% растворе D-маннитола с 10 ммоль/л Na-ацетата, pH 5,4; атезолизумаб (Tecentriq) в концентрации 60 мг/мл в растворе с 20 ммоль/л гистидина 14 ммоль/л уксусной кислоты, 0,04% полисорбата 20, 4% сахарозы, № серии 3109904, Genentech Inc; PD-L1-His-метка, человеческий, рекомбинантный, полученный в клетках HEK293, Phe19-Thr239, № по каталогу Q9NZQ7, R&D systems, № по каталогу 9049-B7-100, № серии DDIW0116081; PD-L1-Fc, химерный белок Fc человеческого IgG, человеческий, рекомбинантный, полученный в клетках HEK293, Phe19-Thr239, № по каталогу Q9NZQ7, R&D systems, № по каталогу 156-B7-100, № серии DKL2116031. Набор реагентов для иммобилизации человеческих антител, GE Healthcare, № по каталогу BR-1008-39, № серии 10247121. Подвижный буферный раствор: 1-кратный ФСБ с добавлением 0,005% Твина-20, дегазированный и фильтрованный через фильтр 0,2 мкм.

Один из стандартных подходов к определению параметров связывания состоит в иммобилизации антител захвата на микрочипе с последующим нанесением исследуемых антител, а затем лиганда. Однако для данного лиганда из-за присутствия фрагмента Fc IgG в химерном белке PD-L1-Fc иммобилизацию, опосредованную античеловеческими антителами, нельзя использовать. Поэтому для PD-L1-Fc использован альтернативный подход, проиллюстрированный на фиг. 17. В случае His-меченой версии лиганда PD-L1 для иммобилизации антитела использовали подход, проиллюстрированный на фиг. 17, панель А. Для исследования связывания химерного белка PD-L1-Fc использовали два альтернативных метода: (1) прямая иммобилизация самого PD-L1-Fc, проиллюстрированная на фиг. 17, панель В, и (2) иммобилизация исследуемых антител, B60-55-1 и антитела сравнения атезолизумаба, проиллюстрированная на фиг. 17, панель С.

Все белки ковалентно присоединяли к микрочипу, используя одинаковые химические методы и протокол. Белки, конъюгированные с микрочипом, включали моноклональные антитела к человеческому IgG, лиганд PD-L1-Fc, B60-55-1 и атезолизумаб. Антитела к человеческому IgG и PD-L1-Fc использовали в буферных растворах, совместимых с методикой конъюгации, а препараты B60-55-1 и атезолизумаб перед связыванием подвергали интенсивному диализу против 0,1-кратного ФСБ. SR7000 Gold Sensor Slide устанавливали в прибор и активировали подвижным буферным раствором 1-кратного ФСБ с добавлением 0,005% Твина 20 в течение 5 мин со скоростью 250 мкл/мин, затем оставляли для стабилизации при 25 мкл/мин. Все стадии выполняли при температуре 25°C. Препараты белка разводили буферным раствором для иммобилизации (10 ммоль/л ацетата Na, pH 5,0) до конечной концентрации 25 мкг/мл. Реагенты для процедуры иммобилизации готовили, как описано ниже: активирующий агент EDC/NHS, состоящий из EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида) в концентрации 40 мг/мл и NHS (N-гидроксисукцинимид) в концентрации 10 мг/мл в воде, 1 моль/л этаноламина HCl, pH 8,5 в воде. Активация: активирующий агент EDC/NHS вводили в микрочип со скоростью 10 мкл/мин в течение 8 мин с последующим промыванием в течение 5 мин подвижным буферным раствором. Иммобилизация: антитело к IgG человека в конечной концентрации 25 мкг/мл вводили в микрочип со скоростью 10 мкл/мин в течение 8 мин. Деактивация: непрореагировавшие активные группы на поверхности микрочипа блокировали путем ввода раствора 1 моль/л этаноламина HCl со скоростью 10 мкл/мин в течение 7 мин. После конъюгации антитела микрочип промывали подвижным буферным раствором в течение 15 мин со скоростью 25 мкл/мин.

Для исследования взаимодействия PD-L1-His-меченого лиганда с B60-55-1 и атезолизумабом использовали подход с иммобилизацией антитела. Антитело к человеческому IgG ковалентно присоединяли к микрочипу и использовали для захвата исследуемых антител, как проиллюстрировано на фиг. 17, панель А. Микрочип с иммобилизованным антителом к человеческому IgG уравнивали подвижным буфером при скорости потока 25 мкл/мин в течение 10-15 мин. Исследуемые антитела B60-55-1 или атезолизумаб наносили со скоростью 25 мкл/мин в течение 2 мин, затем микрочип промывали в течение 3 мин для удаления несвязанных антител. Готовили 2-кратные разведения лиганда PD-L1-His подвижным буфером, начиная с концентрации 100 нмоль/л. Использовали семь концентраций: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 и 1,56 нмоль/л. Лиганд наносили со скоростью 25 мкл/мин в течение 3 мин. После нанесения лиганда проводили фазу диссоциации эксперимента, используя подвижный буфер со скоростью потока 25 мкл/мин в течение 5 мин. Диссоциацию белковых комплексов, связанных с иммобилизованным антителом к человеческому IgG, проводили путем пропускания через микрочип раствора 3 моль/л MgCl₂ со скоростью 25 мкл/мин в течение 30 с. Для анализа была получена и использована серия сенсограмм иммобилизованного B60-55-1 или атезолизумаба с различными концентрациями лиганда PD-L1-His, как показано на фиг. 18. Для анализа взаимодействия PD-L1-His с исследуемыми антителами использовали модель оценки кинетики связывания 1:1. Были получены следующие значения Kd: B60-55-1 Kd = 40,2 нмоль/л; атезолизумаб Kd = 0,67 нмоль/л.

Результаты исследования показали, что аффинность связывания мономерного PD-L1 с антителом сравнения атезолизумабом была на 2-log выше, чем с B60-55-1, 0,67 нмоль/л по сравнению с 40,2

нмоль/л, соответственно. Более низкая аффинность взаимодействия B60-55-1-PD-L1-His была связана с более высокой скоростью диссоциации, при этом фаза ассоциации B60-55-1 и атезолизумаба была по существу идентичной, как следует из таблицы на фиг. 18.

Для исследования связывающих свойств лиганда PD-L1-Fc с B60-55-1 и его антителом сравнения атезолизумабом химерный белок PD-L1-Fc непосредственно иммобилизовали на чипе, как проиллюстрировано на фиг. 17, панель В. Для определения условий эффективной регенерации микрочипа были проведены поисковые эксперименты. Было обнаружено, что раствор 3 моль/л $MgCl_2$ не вызывает диссоциацию связанных антител (ни B60-55-1, ни атезолизумаба) из иммобилизованного PD-L1-Fc. Было исследовано несколько условий регенерации, включая буферные растворы 10 ммоль/л глицина HCl с pH 3,0, pH 2,5, pH 2,0 и 10 ммоль/л NaOH. Определили, что буферные растворы с pH 3,0 и pH 2,5 неэффективно удаляют связанные антитела, а обработка NaOH инактивировала лиганд, что вело к утрате связывания. Впоследствии заключили, что для этой серии экспериментов подходит раствор глицина HCl, pH 2,0.

Лиганд PD-L1-Fc иммобилизовали на микрочипе, как описано в этом примере выше, и наносили серию концентраций B60-55-1 или атезолизумаба. Готовили 2-кратные разведения B60-55-1 или атезолизумаба в подвижном буфере, начиная с концентрации 100 нмоль/л. Использовали семь концентраций: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 и 1,56 нмоль/л. Лиганд наносили со скоростью 25 мкл/мин в течение 3 мин. После нанесения лиганда проводили фазу диссоциации эксперимента, используя подвижный буферный раствор со скоростью потока 25 мкл/мин в течение 5 мин. Для анализа была получена и использована серия сенсограмм иммобилизованного PD-L1-Fc при различных концентрациях B60-55-1 или атезолизумаба (показано на фиг. 19). Для анализа взаимодействий иммобилизованного PD-L1-His с исследуемыми антителами использовали модель оценки кинетики связывания 1:1. Были получены следующие значения Kd: B60-55-1 Kd = 0,66 нмоль/л; атезолизумаб Kd = 0,26 нмоль/л.

Результаты исследования показали, что аффинность связывания иммобилизованного димерного PD-L1-Fc для B60-55-1 и антитела сравнения атезолизумаба была сходной и составляла 0,6 нмоль/л по сравнению с 0,26 нмоль/л, соответственно, как показано в таблице на фиг. 19. Наблюдаемое сходство значений аффинности обоих антител отражает взаимодействия с димерным лигандом, которое явно отличается от взаимодействия с мономерным His-меченным вариантом лиганда.

Для дальнейшей оценки связывающих свойств исследуемых антител B60-55-1 или атезолизумаб ковалентно связывали с микрочипом, как проиллюстрировано на фиг. 17, панель С. Этот подход обеспечивал прямое сравнение обоих вариантов лиганда PD-L1, His-меченного и Fc-химерного белков. Была проведена повторная оценка условий регенерации этой системы связывания, и обнаружено, что достаточное восстановление обеспечивал раствор 10 ммоль/л глицина HCl, pH 2,0. B60-55-1 и атезолизумаб иммобилизовали на отдельных сенсорных микрочипах, как описано в этом примере, и последовательно наносили различные концентрации PD-L1-His или химерного белка PD-L1-Fc на иммобилизованные антитела. Готовили двукратные разведения PD-L1-His или PD-L1-Fc подвижным буфером, начиная с концентрации 100 нмоль/л. Использовали семь концентраций: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 и 1,56 нмоль/л. Лиганды наносили со скоростью 25 мкл/мин в течение 3 мин. После нанесения лиганда проводили фазу диссоциации эксперимента, используя подвижный буферный раствор со скоростью потока 25 мкл/мин в течение 5 мин. Для анализа была получена и использована серия сенсограмм иммобилизованного B60-55-1 или атезолизумаба при различных концентрациях PD-L1-His или химерного белка PD-L1-Fc, как показано на фиг. 20 и 21. Для анализа взаимодействия иммобилизованного B60-55-1 с обоими вариантами лиганда PD-L1-His и PD-L1-Fc использовали модель оценки кинетики связывания 1:1. Были получены следующие значения Kd: для B60-55-1 и мономерного лиганда PD-L1-His Kd = 14,3 нмоль/л; для димерного лиганда PD-L1-Fc Kd = 0,45 нмоль/л; для атезолизумаба и мономерного лиганда PD-L1-His Kd = 0,62 нмоль/л, для димерного лиганда PD-L1-Fc Kd = 0,19 нмоль/л.

Таким образом, при сравнении значений аффинности связывания мономерного PD-L1-His и димерного PD-L1-Fc с B60-55-1 и его антитела сравнения атезолизумабом выявлено, что B60-55-1 характеризуется аффинностью к PD-L1-Fc, приблизительно на 2-log превышающей PD-L1-His, при этом атезолизумаб характеризуется сходными значениями аффинности к PD-L1-His и PD-L1-Fc. Последнее указывает на то, что атезолизумаб не может различать мономерные и димерные формы этого лиганда.

При оценке связывающих свойств B60-55-1 и атезолизумаба неожиданно выявлено, что B60-55-1 способен стабильно дифференцировать мономерную и димерную формы своей распознаваемой мишени PD-L1, что отличает его от антитела сравнения, применяемого в настоящее время в клинических условиях.

Пример 12. Сопоставимость эффекторных функций антитела B60-55-1 и атезолизумаба.

В данном примере описан дополнительный анализ и сравнение эффекторных функций антитела B60-55-1 с таковыми антитела сравнения атезолизумабом. Настоящее описание включает оценку связывания с рецепторами Fc гамма: CD16a, CD32a и CD64; антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) с использованием клеток, положительных по PD-L1; комплемент-индуцируемой цитотоксичности (CDC), связывания C1q и связывания FcRn.

Помимо роли в связывании антигена, антитела могут регулировать иммунные ответы посредством

взаимодействия с рецепторами Fc гамма за счет их взаимодействия с участком Fc антитела. Эти взаимодействия с рецепторами, присутствующими на естественных киллерах (NK) и других миелоидных клетках, индуцируют высвобождение этими клетками цитокинов, в частности, интерферона гамма (IFN γ), и цитотоксических гранул, содержащих перфорин и гранзимы, кульминацией чего является ADCC.

В ходе проведенных исследований было выявлено, что антитело B60-55-1 не характеризуется определяемым связыванием с рецептором CD16a, при этом Kd атезолизумаба для CD 16a составляла 1,6E-5 M; для B60-55-1 не показано определяемого связывания с рецептором CD32a, при этом Kd атезолизумаба для CD32a составляла 4,1E-5 M; B60-55-1 характеризуется в десять раз более низкой связывающей активностью по отношению к рецепторам CD64 по сравнению с другими антителами IgG1, однако характеризуется сходной связывающей активностью по отношению к CD64 в сравнении с атезолизумабом.

Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) представляет собой механизм действия антител, посредством которого инфицированные вирусом или пораженные другим заболеванием клетки становятся мишенью для разрушения компонентами клеточно-опосредованной иммунной системы, в частности, естественными киллерами. Набор реагентов для анализа по гену-репортеру ADDC Bioassay Core Kit производства компании Promega (№ по каталогу G7014) представляет собой набор для анализа биолюминесцентного репортера для количественного определения ADCC. В этом анализе эффекторная клетка, экспрессирует на клеточной поверхности рецепторы Fc γ RIIIa, которые связываются с фрагментами Fc исследуемых антител, связанных с поверхностью клеток, экспрессирующих целевой рецептор. Приведение клеток-мишеней в контакт с эффекторными клетками посредством биологических механизмов приводит к активации транскрипции генов путем, опосредованным ядерным фактором активированных T-лимфоцитов (Nuclear factor of activated T-cells, NFAT) в эффекторных клетках, что запускает экспрессию люциферазы светляка, определяемую количественно на основании люминесценции. Поскольку для B60-55-1 не показано какого-либо связывания с CD16a и CD32a, проявлений какой-либо ADCC этой молекулой не ожидалось. Анализ проводили с использованием положительной по PD-L1 линии клеток A2058. ADCC B60-55-1 и атезолизумаба сравнивали с ADCC ритуксимаба - известного антитела, проявляющего сильную ADCC.

Как и ожидали для данного сконструированного антитела IgG1, B60-55-1 не проявляло существенной ADCC по сравнению с ритуксимабом (контроль на фиг. 22), хотя проявляло сопоставимую ADCC с атезолизумабом.

B60-55-1 и атезолизумаб представляют собой антитела, нацеленные на PD-L1, поэтому проводили сравнение связывания этих антител с C1q. Для оценки аффинности, с которой эти оба антитела к PD-L1 взаимодействуют с C1q, использовали метод тИФА для двух антигенсвязывающих участков. В этом анализе оба антитела вносили в лунки планшета в концентрации 25, 20, 15, 10, 8, 4, 2, 1, 0,5 и 0 мкг/мл на ночь при температуре 4°C. Затем планшет промывали и блокировали раствором SuperBlock, после чего добавляли C1q (Sigma, № по каталогу C1740) в концентрации 2 мкг/мл в связывающем буферном растворе и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшет промывали и добавляли в лунки планшета конъюгат антитела к C1q с HRP (Thermo, № по каталогу PA1-84324) в разведении 1:250 в связывающем буферном растворе (100 мкл/лунка) на 1 ч при комнатной температуре. Несвязанное HRP-конъюгированное антитело удаляли промыванием в отмывочном буферном растворе. Активность HRP определяли с использованием хромогенного субстрата ТМБ. Цветную реакцию останавливали добавлением серной кислоты и регистрировали показание планшета при 450 нм. Значение EC₅₀ рассчитывали после подгонки 3-параметрической кривой для исследуемого и стандартного образца. Регистрируемым показателем является % EC₅₀ от EC₅₀ стандартного образца по отношению к EC₅₀ исследуемого образца, так что более высокий % означает более высокую активность в исследуемом образце. Цель этих экспериментов состояла в определении связывающей активности атезолизумаба и B60-55-1 с C1q с использованием формата тИФА.

Результаты анализа тИФА показаны на фиг. 23. Было определено, что EC₅₀ связывания атезолизумаба с C1q составляла 14,9 мкг/мл, при этом EC₅₀ связывания B60-55-1 с C1q составляла 6,9 мкг/мл. Таким образом, эти характеристики связывания сопоставимы.

Кроме того, проводили сравнение способности к индукции CDC на PD-L1-положительных клетках (клетки A2058) между B60-55-1 и атезолизумабом. В данном анализе лизис клеток, "тени клеток" (лизированные клетки), можно наблюдать под микроскопом и определять количественно с помощью люминесцентного реагента CytoTox-Glo, добавляемого к клеткам на 1 ч.

Оба препарата показали очень низкую CDC. Для атезолизумаба EC₅₀ составляла 0,09 мкг/мл, при этом EC₅₀ B60-55-1 составляла 0,05 мкг/мл.

Период полувыведения IgG зависит от неонатального рецептора Fc (FcRn), который среди прочих функций защищает IgG от катаболизма. FcRn связывает домен Fc IgG в кислой среде, предотвращая распад IgG в компартментах лизосом после эндоцитоза с его последующим высвобождением в кровотоке. Проводили сравнение связывания B60-55-1 и атезолизумаба с рецептором FcRn, стабильно экспрессируемым клетками СНО.

В этом исследовании было показано, что B60-55-1 связывается с FcRn с Kd 4,7e-7M, что характерно

для антител, при этом атезолизумаб проявлял несколько более высокую аффинность к FcRn с Kd 1E-7M.

Пример 13. Сравнительная оценка активности антитела В60-55-1, атезолизумаба и пембролизумаба в реакции смешанной культуры лимфоцитов.

Для оценки активности В60-55-1 и атезолизумаба в отношении активации Т-лимфоцитов проводили анализ реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ). Активацию Т-лимфоцитов определяли количественно на основании концентрации интерлейкина 2 (ИЛ-2), секретируемого Т-лимфоцитами. Дендритные клетки (DC) и CD4⁺ Т-лимфоциты выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК). Активность пембролизумаба при активации Т-лимфоцитов в СКЛ использовали в качестве внутреннего контроля для мониторинга качества выполнения анализа. Анализ значений полумаксимальной эффективной концентрации (EC₅₀) проводили путем подгонки сигмовидной нелинейной регрессионной модели зависимости "доза-отклик" с помощью программы GraphPad Prism.

Реагенты и материалы.

RPMI 1640: Gibco, Invitrogen (№ по каталогу 22400); ФБС, Gibco, (№ по каталогу 10099); пенициллин-стрептомицин (П/С): Gibco, Invitrogen (№ по каталогу 10378); фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ): Gibco, Invitrogen (№ по каталогу 10010-023); антитела контроля качества (КК) для дендритных клеток: антитело к CD1a [HI149] (ФИТЦ), Abcam (ab18231), антитело к CD83 [HB15e] (ФИТЦ), Abcam (ab134491), антитело к CD86 [BU63] (ФИТЦ), Abcam (ab77276), антитело к HLA DR [GRB1] (ФИТЦ), Abcam (ab91335); набор реагентов для выделения CD4⁺ Т-лимфоцитов: Miltenyi Biotec (№ по каталогу 130-096-533); набор реагентов для выделения пан-моноцитов: Miltenyi Biotec (№ по каталогу 130-096-537).

Линия клеток.

Дендритные клетки, приготовленные из свежеполученной крови человека (более 20 здоровых доноров); CD4⁺ Т-лимфоциты, приготовленные из свежеполученной крови человека (более 20 здоровых доноров).

Набор реагентов.

Набор Human IL2 HTRF (Cisbio, № по каталогу 64IL2PEB).

Устройство для детектирования.

PHERAStarPlus, BMG Labtech.

Приготовление клеток.

CD4⁺ Т-лимфоциты очищали с помощью набора реагентов для выделения CD4⁺ Т-лимфоцитов. МКПК были получены путем центрифугирования в градиенте плотности с использованием реактива Lymphoprep, клетки поддерживали в полной среде при температуре 37°C/5% CO₂, в соответствии с протоколом компании GenScript.

Дендритные клетки очищали с помощью набора реагентов для выделения пан-моноцитов. МКПК были получены путем центрифугирования в градиенте плотности с использованием реактива Lymphoprep, клетки поддерживали в полной среде при температуре 37°C/5% CO₂, в соответствии с протоколом компании GenScript. Чистота дендритных клеток была валидирована на основании их поверхностных маркеров с помощью FACS (CD1a, CD83, CD86 и HLA-DR).

Приготовление антител.

Образцы доставляли в сухой упаковочной коробке и хранили при температуре 4°C до исследования. Образцы разводили средой RPMI 1640 и использовали в исследованиях.

Реакция смешанной культуры лимфоцитов для тестирования антител.

Эффекторные клетки (CD4⁺ Т-лимфоциты) собирают центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3 мин.

Готовят серийное разведение исследуемых образцов аналитическим буферным раствором.

Концентрированный раствор эффекторных клеток высевают в 96-луночный аналитический планшет и добавляют исследуемый образец.

Клетки-мишени (дендритные клетки) собирают центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3 мин.

Для инициации реакции добавляют клетки-мишени и мягко перемешивают.

Планшет инкубируют в инкубаторе при температуре 37°C/5% CO₂ в течение 3 дней.

Проводят тестирование человеческого ИЛ-2 и регистрируют показания планшета.

Диапазон исследуемых концентраций для В60-55-1 и атезолизумаба: начиная с 300 нмоль/л, 3-кратное разведение, 10 точек в трех повторностях.

Диапазон исследуемых концентраций для пембролизумаба: начиная с 10 мкг/мкл, 5-кратное разведение, 6 точек в трех повторностях.

Анализ реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ).

Результаты анализа СКЛ показаны на фиг. 24, В60-55-1 и атезолизумаб были способны к активации Т-лимфоцитов в СКЛ с различными уровнями секреции ИЛ-2. Данные по активации Т-лимфоцитов пембролизумабом, используемым в качестве контроля, согласуются с историческими данными. Анализ данных СКЛ представлен в табл. 2. Значения EC₅₀ для В60-55-1 и атезолизумаба в анализе СКЛ составляли 0,4665 нмоль/л и 21,53 нмоль/л соответственно. Таким образом, В60-55-1 активирует Т-лимфоциты в

анализе СКЛ с существенно повышенной активностью.

Таблица 2

Сводные данные анализа наилучших соответствий для СКЛ

	пембролизумаб	В60-55-1	пембролизумаб	атезолизумаб
Минимум	60,62	49,49	68,18	55,2
Максимум	164,2	94,34	161,3	86,13
Log EC ₅₀	-0,8871	-0,3311	-0,7364	1,333
Угловой коэффициент Хилла	0,7036	1,097	0,9005	1,356
EC ₅₀	0,1297 мкг/мл	0,4665 нмоль/л	0,1835 мкг/мл	21,53 нмоль/л
EC ₅₀ (нмоль/л)	0,8705	0,4665	1,2315	21,53

Пример 14. Оценка эффективности В60-55-1 при введении в модели подкожной карциномы ободочной кишки MC38-hPD-L1 мыши у мышей с гуманизированным PD-L1.

Цель этого исследования состояла в тестировании эффективности В60-55-1 и его антитела сравнения атезолизумаба *in vivo* в дозе 10 мг/кг при введении мышам с гуманизированным PD-L1, которым была привита подкожно линия клеток карциномы ободочной кишки мыши MC38-hPD-L1.

Реагенты и оборудование.

Модифицированная Дульбекко среда Игла (DMEM): Cellgro, № по каталогу 10-013-CVR, хранение при температуре 4°C. Фетальная бычья сыворотка (ФБС): Excell, № по каталогу FSP500, хранение при температуре -20°C. Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ): Gibco, № по каталогу 20012027, хранение при температуре 4°C. Весы: Shanghai Shun Yu Heng Ping Science and Equipment Co. Ltd, № по каталогу MP5002. Штангенциркуль: Hexagon Metrolog, № по каталогу 00534220.

Исследуемый и контрольный препараты.

Антитело В60-55-1 хранили в ФСБ в концентрации 50 мг/мл; отрицательный контроль, внутривенный иммуноглобулин (IVIg) (Guang Dong Shuang Lin Biopharmacy Co. Ltd), № серии 20160407, хранили в ФСБ в концентрации 50 мг/мл; положительное контрольное антитело атезолизумаб (Genentech/Roche, № серии 3109904) в концентрации 60 мг/мл хранили в буферном растворе, содержащем ледяную уксусную кислоту (16,5 мг), L-гистидин (62 мг), полисорбат 20 (8 мг) и сахарозу (821,6 мг).

Приготовление раствора для введения.

Перед введением исследуемый и контрольный препараты разводили в ФСБ, временно хранили при температуре 2-8°C и использовали при комнатной температуре в течение 4 ч. Оставшиеся неразведенные исследуемый и контрольный препараты хранили при температуре 2-8°C.

Экспериментальные животные.

Сорок самцов гуманизированной линии мышей B-hPD-L1 C57BL/6 получали от компании Beijing Biocytogen Co. Ltd. (сертификат качества №: 201716816).

Условия содержания животных.

Животных содержали в свободном от специфической патогенной микрофлоры помещении в виварии компании Beijing Biocytogen Co., Ltd. по 5 животных в отдельной вентилируемой клетке (individual ventilated cage, IVC). Животных акклиматизировали в течение от трех дней до одной недели после поступления.

Температуру поддерживали на уровне 20-26°C, а влажность поддерживали на уровне 40-70%. Клетки были выполнены из поликарбоната, их размер составлял 300×180×150 мм. В качестве подстилки использовали стерилизованные в автоклаве древесные опилки, которые меняли раз в неделю. Идентификационная этикетка на каждой клетке содержала следующую информацию: количество животных, пол, линия, дата получения, препарат, номер группы и дата начала введения препарата. Животным был предоставлен стерилизованный в автоклаве сухой гранулированный корм и вода без ограничений в течение всего периода исследования. Корм был марки "свободный от специфической патогенной микрофлоры" (СПФ) и приобретен в компании Beijing Keao Xieli Feed Co., Ltd. Воду очищали ультрафильтрацией. Животных маркировали нанесением кода на уши.

Экспериментальные методы и процедуры.

Родительская линия клеток карциномы ободочной кишки мыши MC38 была приобретена у компании Shunran Shanghai Biological Technology Co. Ltd. Линия клеток MC38-hPD-L1 была сконструирована путем замещения мышинового PD-L1 человеческим PD-L1 в компании Biocytogen Co, Ltd. Клетки поддерживали в виде монослоя культуры в питательной среде DMEM с добавлением 10% инактивированной нагреванием ФБС и пересевали два раза в неделю. Для инокуляции опухоли клетки, выращенные до экспоненциальной фазы роста, собирали и считали.

Для развития опухоли каждой мыши вводили опухолевые клетки MC38-hPD-L1 (5×10^5) подкожно с 0,1 мл ФСБ в правый бок спереди. Животных, несущих опухоли, случайным образом включали в три

экспериментальных группы после достижения опухолью размера 100 мм³. Каждая группа состояла из восьми мышей. Исследуемый и контрольный препараты вводили мышам, несущим опухоли, по заданной схеме, как показано ниже.

Схема дозирования

Группы	Применяемый препарат	Кол-во животных х	Дозы (мг/кг)	Рабочая конц. (мг/мл)	Путь введения	Временной график
1	IVIG	8	10	1	и/п	2 р/нед × 8
2	Положительный контроль	8	10	1	и/п	2 р/нед × 8
3	B60-55-1	8	10	1	и/п	2 р/нед × 8

Примечания: (1) объем вводимой дозы зависел от массы тела (10 мкл/г).

(2) и/п соответствует интраперитонеальному пути.

(3) 2 р/нед × 8 соответствует периодичности введения два раза в неделю и введению 8 раз.

Если потеря массы тела у мыши превышала 10%, временной график корректировали, и объем дозы соответственно уменьшали или животное исключали из исследования.

После завершения введения продолжали проводить мониторинг объема опухоли и массы тела два раза в неделю до 2 недель.

Животных подвергали эвтаназии CO₂ с последующим разрушением мозга для подтверждения эвтаназии.

Индекс размера опухоли.

Размер опухоли измеряли два раза в неделю в двух измерениях, используя штангенциркуль, и объем выражали в мм по формуле: $V = 0,5 a \times b^2$ где а и b представляли собой длинный и короткий диаметры опухоли, соответственно.

Животных взвешивали перед инокуляцией опухоли и группированием, затем два раза в неделю в течение всего эксперимента и, наконец, перед эвтаназией в конечной точке эксперимента. Животных взвешивали в случае наступления случайной гибели или предсмертного состояния животного.

В течение всего периода эксперимента два раза в день (утром и вечером) проводили проверку животных для оценки их поведения и состояния, включая без ограничений внешний вид язв опухоли, психическое состояние животного, визуальную оценку потребления корма и воды и т.д.

В момент окончания исследования опухоли собирали и взвешивали. Делали снимки как умерщвленных животных, так и собранных опухолей, которые впоследствии прикрепляли к отчету об исследовании.

Показатель оценки препарата.

Относительное ингибирование роста опухоли (tumor growth inhibition, TGI, %): $TGI, \% = (1 - T/C) \times 100\%$. Т и С относятся к среднему значению относительного объема опухоли (RTV) для групп, получающих исследуемый препарат и раствор-носитель, соответственно, в определенный день. Т/С, % означает относительную скорость пролиферации^[1], которую определяют с помощью формулы: $T/C, \% = T_{RTV}/C_{RTV} \times 100\%$ (T_{RTV} : среднее RTV групп, получающих исследуемый препарат; C_{RTV} : среднее RTV группы, получающей раствор-носитель; $RTV = V_t/V_0$, V_0 относится к объему опухоли при группировании, V_t относится к объему опухоли, измеренному в каждой указанной временной точке после введения препарата).

Коэффициенты ингибирования роста опухоли (Inhibition ratios of tumor weight, IRTW, %): в конечной точке опухоли животных взвешивали, определяли среднюю массу опухоли в каждой группе и рассчитывали IRTW, % по формуле:

$$IRTW_{\%} = (W_{\text{контрольная группа}} - W_{\text{экспериментальная группа}}) / W_{\text{контрольная группа}} \times 100. W \text{ относится к средней массе опухоли.}$$

Анализ данных проводили, используя t-критерий Стьюдента/двусторонний дисперсионный анализ, и $P < 0,05$ считали статистически значимой. Учитывали результаты статистического анализа и биологические наблюдения.

Результаты.

В течение всего эксперимента явных клинических признаков не наблюдали. Масса тела большинства животных постепенно увеличивалась в течение исследования. Средняя масса тела и изменения массы тела со временем в процентах представлены на фиг. 25 и в табл. 3. У животных в группе, получавшей B60-55-1, статистически значимых различий массы тела по сравнению с контрольными группами не отмечено ($P > 0,05$).

Таблица 3
Изменения массы тела у мышей с гуманизированным B-hPD-L1 с привитой опухолью ободочной кишки мыши MC38-hPD-L1

До	Применяемый препарат	Количество животных	Масса тела (г) ^a До группирования	Масса тела (г) ^a 23 дня после группирования	p ^b	Изменение массы тела (г)
1	IVIG	10	22,7 ± 0,5	27,2 ± 1,0	—	+4,5
2	Положительный контроль	10	22,9 ± 0,7	28,3 ± 1,2	0,8	+5,4
3	B60-55-1	10	23,3 ± 0,7	28,2 ± 1,1	0,9	+4,9

Примечание:

a: Среднее значение ± стандартная ошибка (SEM).

b: Статистический анализ с помощью независимого выборочного Т-критерия для среднего значения 10 показателей массы тела в экспериментальной группе по сравнению с группой, получавшей раствор-носитель, в день 23 после группирования.

У всех мышей проводили тщательный мониторинг роста опухоли на протяжении всего эксперимента с измерением размера опухоли и регистрацией два раза в неделю. Ингибирование роста опухоли (TGI, %) рассчитывали и анализировали в наилучшей терапевтической точке (23 дня после группирования). Результаты статистического анализа приведены в табл. 4 и 5. Рост опухоли у отдельных мышей в трех группах наносили на график на фиг. 26 и фиг. 27. Уменьшение скорости роста опухоли наблюдали как после введения атезолизумаба, так и после введения B60-55-1. Отчетливая регрессия опухоли в группах, получавших атезолизумаб и B60-55-1, по отдельности наблюдалась у 2/8 и 1/8 мышей.

Таблица 4
Ингибирование роста опухоли B60-55-1 в день 23 после группирования

Группы	Количество животных	Объем опухоли (мм ³) ^a		TGI _{Tv} (%)	p ^b
		До группирования	23 дня после группирования		
G1: IVIG	10	119 ± 4	2078 ± 459	—	—
G2: положительный контроль	10	19 ± 4	1046 ± 336	52,7	0,10
G3: B60-55-1	10	120 ± 5	1022 ± 552	53,9	0,17

Примечание:

a: Среднее значение ± стандартная ошибка (SEM).

b: Статистический анализ с помощью t-критерия для объединенного стандартного отклонения среднего объема опухоли в экспериментальной группе по сравнению с группой, получавшей раствор-носитель, в день 23 после группирования.

Таблица 5
Статистический анализ объема опухоли в различных группах B60-55-1

Группы	z
2: положительный контроль	0,970
3:	B60-55-1 -

Примечание:

Статистический анализ с помощью t-критерия для объединенного стандартного отклонения среднего объема опухоли в день 23 после группирования.

Все опухоли у умерщвленных мышей вырезали, фотографировали и взвешивали в день 29 после группирования. Результаты статистического анализа массы опухолей приведены в табл. 6 и на фиг. 28. Поскольку после завершения введения опухоли все еще росли, скорость ингибирования роста опухоли (TGI_{Tv}, %) была снижена по сравнению с показателем в день 23. Поэтому значения массы опухоли в экспериментальных группах в конечной точке исследования (день 23) статистически значимо не отличались от группы, получавшей раствор-носитель (P>0,05).

Таблица 6

Ингибирование роста опухоли B60-55-1 в день 29 после начала введения препарата

Группы	Количество животных	Масса опухоли (г) ^a	Снижение массы опухоли IRTW, %	P ^b
G1: IVIG	10	4,653 ± 1,009	--	--
G2: положительный контроль	10	2,596 ± 0,860	44,2	0,193
G3: B60-55-1	10	3,173 ± 1,570	31,8	0,447

Примечание:

a: Среднее значение ± стандартная ошибка (SEM).

b: Статистический анализ с помощью независимого выборочного T-критерия для среднего значения массы опухоли в день 29 после группирования.

В данном исследовании масса тела большинства животных постепенно увеличивалась. У животных в группе, получавшей B60-55-1, статистически значимых различий массы тела по сравнению с контрольными группами не отмечено ($P > 0,05$), что указывает на безопасность B60-55-1 при настоящей дозировке. Как после введения атезолизумаба, так и после введения B60-55-1 наблюдали снижение скорости роста опухоли. В точке наилучшего ингибирования роста опухоли (день 23 после группирования) средний объем опухоли в контрольной группе, получавшей раствор-носитель, составлял $2078 \pm 459 \text{ мм}^3$, при этом в группах, получавших положительный контрольный препарат, средний объем опухоли составлял $1046 \pm 336 \text{ мм}^3$, а в группах, получавших B60-55-1, средний объем опухоли составлял $1022 \pm 552 \text{ мм}^3$. Ингибирование роста опухоли TGITV, % составляло 52,7% и 53,9% соответственно. В конечной точке данного исследования (день 29 после группирования) отмечена отчетливая регрессия опухоли в группах, получавших атезолизумаб и B60-55-1, у 2/8 и 1/8 мышей, а снижение массы опухоли IRTW, % составляло 44,2% и 31,8% соответственно. По результатам сравнения объемов опухоли у животных в группе, получавшей B60-55-1, с контрольной группой, это соединение обладало противоопухолевой активностью, но без статистически значимых различий.

Таким образом, в данном исследовании показана сопоставимая противоопухолевая эффективность B60-55-1 и атезолизумаба при уровнях дозы 10 мг/кг в отсутствие отрицательного влияния на массу тела животного или индукцию каких-либо нежелательных клинических проявлений.

Пример 15. Оценка B60-55-1 в модели ксенотрансплантата рака молочной железы с использованием гуманизированных мышей NSGTM.

Кроме рака кожи, рак молочной железы является наиболее распространенной формой рака у женщин, поражая около 7% женщин на момент достижения ими 70-летнего возраста (Центры по контролю и профилактике заболеваний, США). По оценкам Американского общества онкологов, в 2017 г. в Соединенных Штатах Америки ожидается диагностирование 252710 новых случаев и 40610 летальных исходов. Для всех стадий в совокупности 5-летняя относительная выживаемость в течение 2006-2012 гг. составляла приблизительно 90%. Третье негативный рак молочной железы является уникальным агрессивным подтипом рака молочной железы, который является клинически негативным в отношении экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона и белка HER2. В настоящее время для лечения этой формы рака не существует таргетной терапии. Разработка модели первичных злокачественных опухолей человека у мышей актуальна для заболеваний человека, поскольку она представляет собой клинически релевантную модель у мышей, воспроизводящую заболевание человека. В компании Jackson Laboratory созданы модели полученного от пациента ксенотрансплантата (PDX) рака молочной железы, а также модели ксенотрансплантатов линий клеток в линии мышей NSGTM с высокой степенью иммунодефицита, а также производных линий от линии NSGTM, таких, как NSGTM-SGM3. Линия мышей NSGTM (NOD.Cg-Prkdcscid112rgtmlWjl/SzJ) была разработана благодаря ее способности к эффективному приживлению клеток и тканей человека. Эффективность прививания значительно улучшена по сравнению с другими линиями мышей в связи с отличиями врожденной иммунной системы. Гуманизированные мыши NSGTM (hu-CD34 NSGTM) представляют собой мышей линии NSGTM, которым путем инъекции введены человеческие гемопоэтические стволовые клетки CD34⁺; они стали важным инструментом исследований иммунной функции человека *in vivo*. Эти мыши обеспечивают надежную доклиническую платформу для применения новых видов иммунотерапии, в частности, специфичных для человека и не проявляющих перекрестную реактивность с мышами. Кроме того, эти модели используют для геномного профилирования заболевания и/или доклинической разработки лекарственных препаратов. В данном исследовании для оценки нового антитела была использована модель ксенотрансплантата линии клеток рака молочной железы MDA-MB-231, установленная у гуманизированных мышей NSGTM.

Мыши и их содержание.

Для данного исследования использовали самок мышей hu-CD34 NSGTM, которым прививали клетки CD34⁺, с >25% клеток CD45⁺ человека в периферической крови через 16 недель после прививания. Ис-

пользовали когорты мышей hu-CD34 NSG™, которым были привиты клетки CD34+ от двух доноров. Мышей содержали в индивидуально проветриваемых полисульфоновых клетках с воздухом, пропущенным через фильтр системы HEPA, при плотности не более 5 мышей на клетку. Виварий полностью освещался искусственными лампами дневного света с контролируемым 12-часовым циклом светлого/темного времени (освещение с 6 ч до полудня до 6 ч после полудня). Нормальные диапазоны температуры и влажности воздуха в виварии составляли 22-26°C и 30-70%, соответственно. Воздухообмен в виварии предусматривал 15 смен воздуха в час. Фильтрованную питьевую воду, подкисленную до pH от 2,5 до 3,0, и стандартный корм для грызунов предоставляли без ограничений.

Методы и наблюдения.

Тридцати восьми (38) мышам hu-CD34 NSG™ имплантировали в жировой слой молочной железы клетки MDA-MB-231 от двух отдельных доноров в количестве 5×10^6 в смеси 1:1 с Matrigel. Массу тела и результаты клинических наблюдений регистрировали 1-2 раза в неделю после имплантации и, как только опухоли становились пальпируемыми, 2 раза в неделю измеряли объем опухоли с помощью цифрового штангенциркуля. Когда объемы опухоли достигали ~ 62 - 98 мм³, мышей рандомизировали на основании объема опухоли и вводили исследуемый препарат в соответствии с табл. 7, начиная в день 0. Массу тела, результаты клинических наблюдений и результаты измерений цифровым штангенциркулем регистрировали 2 раза в неделю после начала введения исследуемого препарата. Животных, которые достигали оценки физического состояния в баллах <2, потери массы тела $\geq 20\%$ или объема опухоли >2000 мм³, подвергали эвтаназии до окончания исследования. Животных с изъязвлением опухоли также подвергали эвтаназии до окончания исследования. Всех остальных животных подвергали эвтаназии путем асфиксии CO₂ на 41-й день исследования.

Таблица 7
Дизайн эксперимента

Группа	N	Соединение	Доза (мг/кг)	Путь введения**	Периодичность введения***
1	10	Раствор-носитель*	Н/П (эквивалентный объем)	В/В	Два раза в неделю в течение 6 недель
2	10	Пембролизумаб	10 (в день 0) 5 (впоследствии)	В/В	Два раза в неделю в течение 6 недель
3	11	B60-55-1	25	В/В	Два раза в неделю в течение 6 недель

* Использовали такой же раствор-носитель, как для приготовления препарата B60-55-1.

** Путь введения был изменен на И/П, поскольку В/В инъекция в хвостовую вену стала невозможной из-за отека. Одному животному из группы 3 в день 35 выполняли И/П введение, и одному животному из группы 1 и двум из группы 3 в день 38 выполняли И/П введение.

*** Препарат вводили животным в дни 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35 и 38.

Результаты.

Сводные результаты исследования представлены на фиг. 29 и фиг. 30. Результаты указывают на сопоставимую эффективность B60-55-1 и пембролизумаба в модели ксенотрансплантата рака молочной железы, используемой в данном исследовании.

Препарат Тесентрик является зарегистрированной торговой маркой компании Genentech USA, Inc.

Хотя в настоящем документе подробно описаны конкретные варианты осуществления изобретения, специалистам в данной области будет понятно, что могут быть выполнены различные модификации и замены более подробных аспектов на основании опубликованных ранее руководств и рекомендаций; и указанные изменения войдут в объем настоящего изобретения. Полный объем изобретения определен прилагаемой формулой изобретения и любой эквивалентной документацией.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий участок, включающее в себя тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87.

2. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, включающая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87.

3. Молекула нуклеиновой кислоты по п.2, где указанная молекула нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 88.

4. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.2, кодирующую антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, включающую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87.

5. Фармацевтическая композиция, включающая антитело, имеющее тяжелую цепь SEQ ID NO: 85 и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, или антигенсвязывающий участок этого антитела; и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество или адъювант.

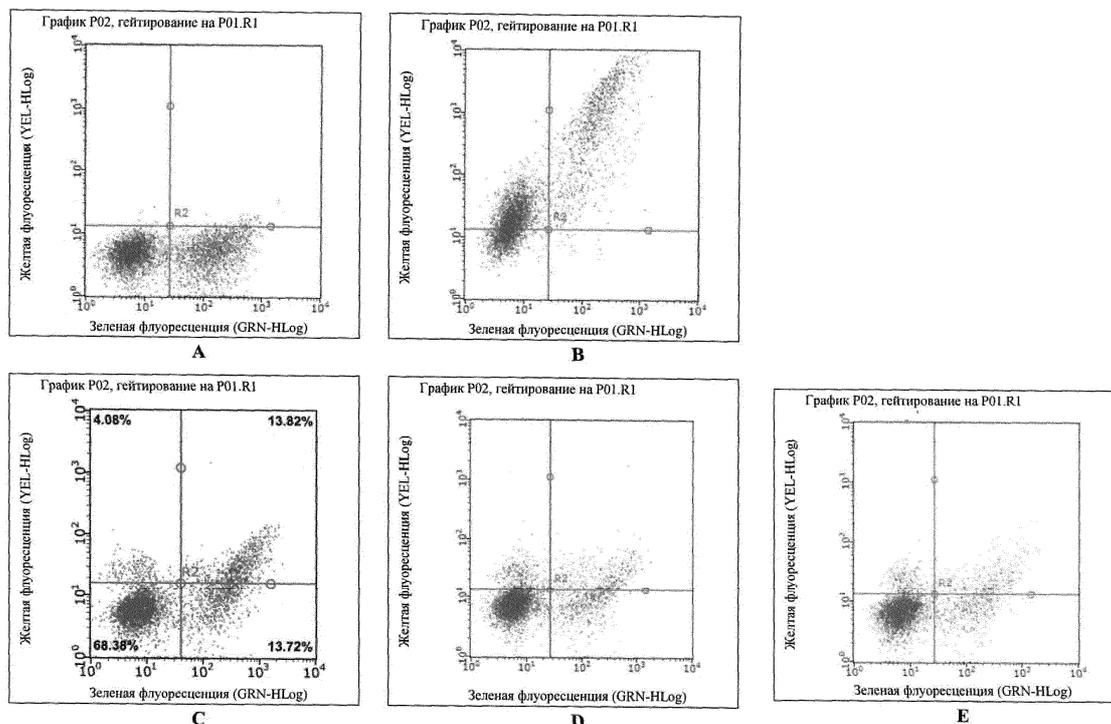
6. Композиция по п.5, включающая в качестве вспомогательного вещества около 275 ммоль/л серина, около 10 ммоль/л гистидина, имеющая рН около 5,9.

7. Композиция по п.6, включающая в качестве вспомогательного вещества около 0,05% полисорбата 80, около 1% D-маннитола, около 120 ммоль/л L-пролина, около 100 ммоль/л L-серина, около 10 ммоль/л L-гистидина HCl, имеющая рН около 5,8.

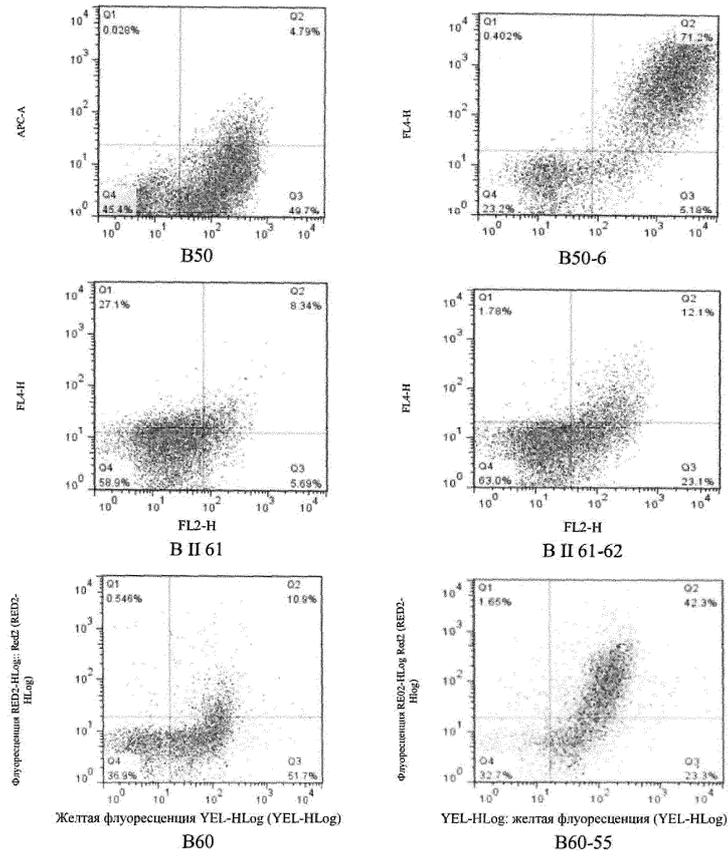
8. Способ лечения или профилактики заболевания или состояния, связанного с модулированием активности человеческого PD-L1, включающий введение пациенту, нуждающемуся в лечении или профилактике заболевания, связанного с модулированием активности человеческого PD-L1, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по пп.5-7.

9. Способ по п.8, в котором заболевание представляет собой рак легкого, рак яичника, рак ободочной кишки, колоректальный рак, меланому, рак почки, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак печени, лимфомы, гематологические злокачественные новообразования, рак головы и шеи, глиомы, рак желудка, рак носоглотки, рак гортани, рак шейки матки, рак тела матки или остеосаркомы.

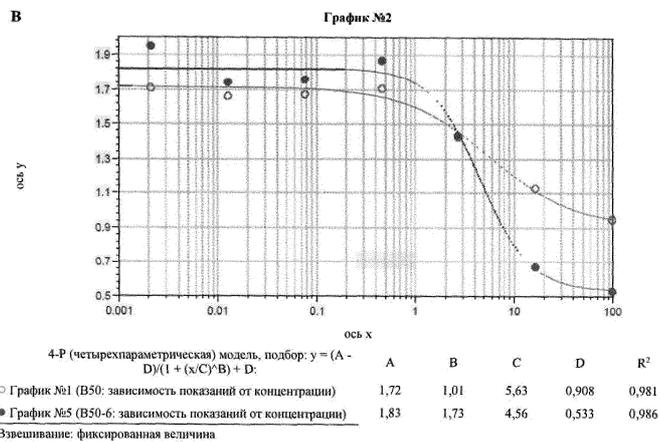
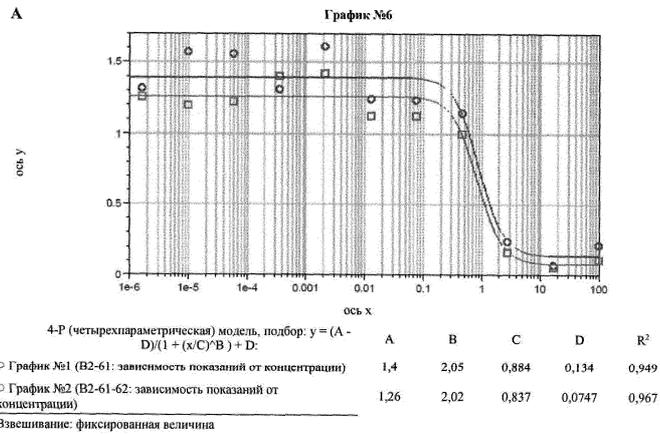
10. Способ по п.9, где заболевание представляет собой инфекцию, вызванную HBV, HCV или HIV.



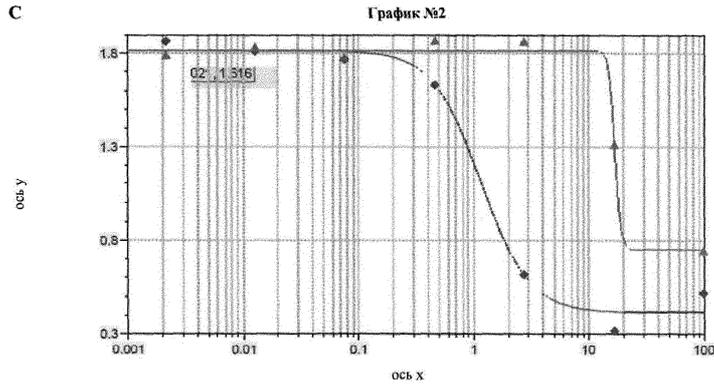
Фиг. 1



Фиг. 2



С

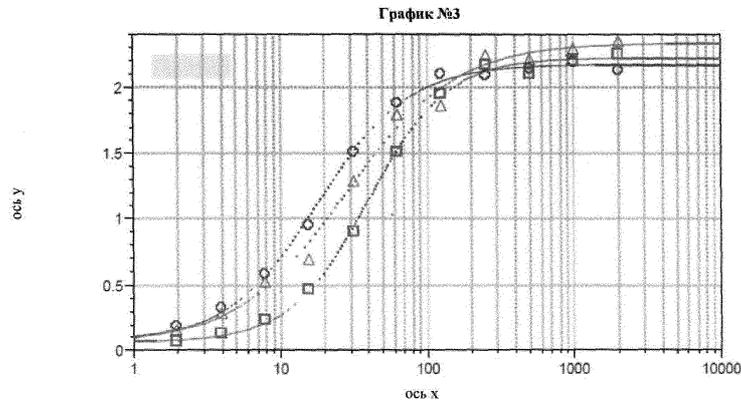


4-Р (четырёхпараметрическая) модель, подбор: $y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$:

	A	B	C	D	R ²
◆ График №8 (B60-55: зависимость показаний от концентрации)	1,82	2,07	1,14	0,414	0,992
○ График №7 (B60: зависимость показаний от концентрации)	1,82	16,4	16,8	0,746	0,993

Взвешивание: фиксированная величина

Фиг. 3

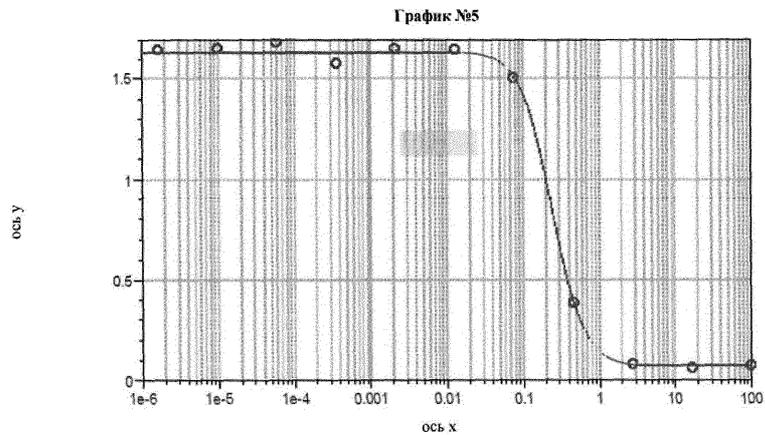


4-Р (четырёхпараметрическая) модель, подбор: $y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$:

	A	B	C	D	R ²
○ График №1 (мАт ВП61-62: зависимость показаний от концентрации)	0,073	1,41	18,3	2,18	0,998
○ График №3 (мАт В50-6: зависимость показаний от концентрации)	0,0501	1,16	28,1	2,34	0,994
□ График №2 (мАт В60-55: зависимость показаний от концентрации)	0,0594	1,61	40	2,23	0,998

Взвешивание: фиксированная величина

Фиг. 4

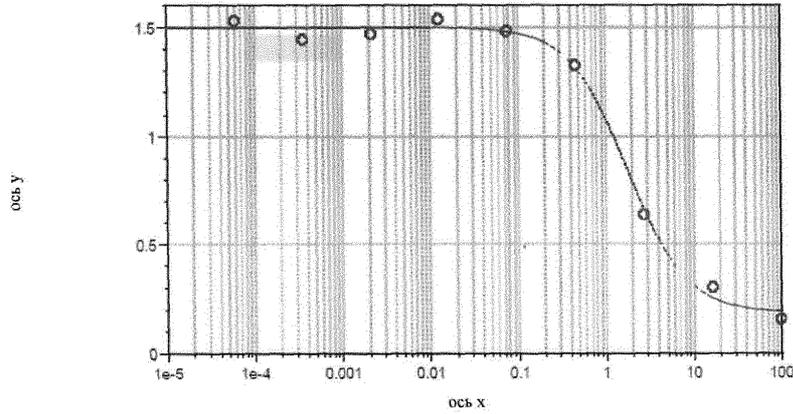


4-Р (четырёхпараметрическая) модель, подбор: $y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$:

	A	B	C	D	R ²
○ График №1 (мАт ВП61-62: зависимость показаний от концентрации)	1,64	2,1	0,24	0,066	0,999

Взвешивание: фиксированная величина

График №2

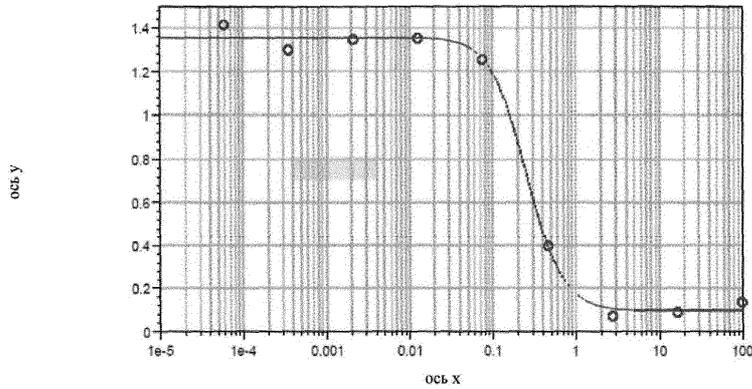


4-Р (четырёхпараметрическая) модель, подбор: $y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$

	A	B	C	D	R ²
○ График №1 (мАт В50-6: зависимость показаний от концентрации)	1,5	1,31	1,76	0,184	0,996

Взвешивание: фиксированная величина

График №3



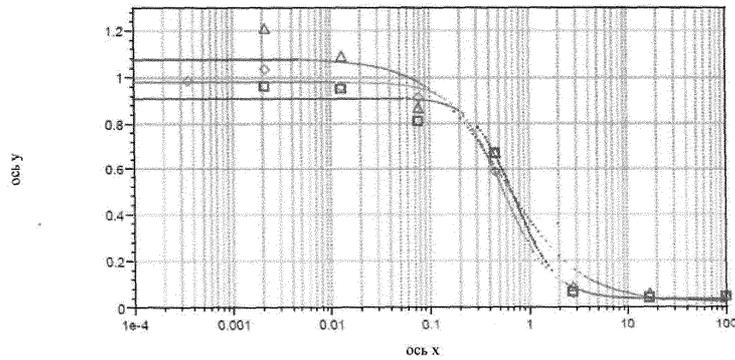
4-Р (четырёхпараметрическая) модель, подбор: $y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$

	A	B	C	D	R ²
○ График №1 (мАт В60-55: зависимость показаний от концентрации)	1,36	1,99	0,255	0,0951	0,996

Взвешивание: фиксированная величина

Фиг. 5

График №1

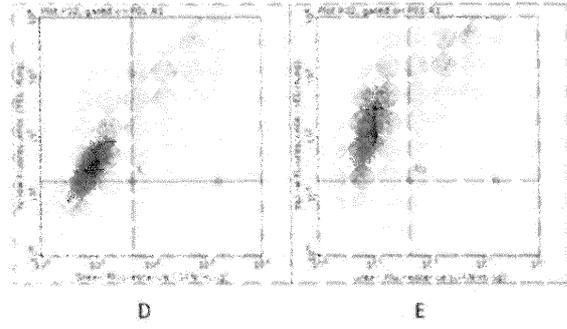
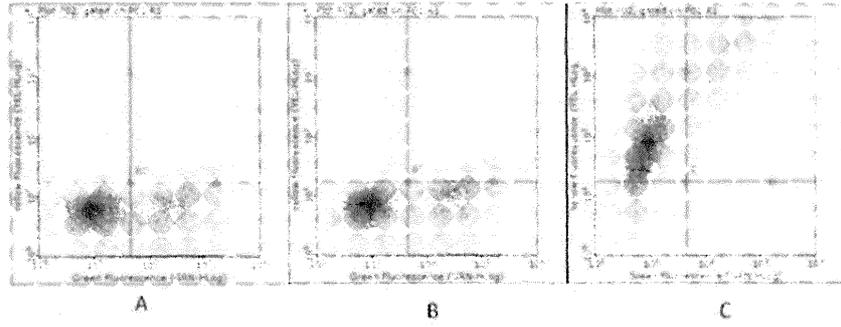


4-Р (четырёхпараметрическая) модель, подбор: $y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$

	A	B	C	D	R ²
○ График №4 (B60-55+CD80-bio: зависимость показаний от концентрации)	0,98	1,83	0,543	0,038	0,996
○ График №3 (B50-6+CD80-bio: зависимость показаний от концентрации)	1,08	1,14	0,553	0,022	0,971
○ График №2 (B2-61-62+CD80-bio: зависимость показаний от концентрации)	0,913	2,07	0,709	0,0344	0,99

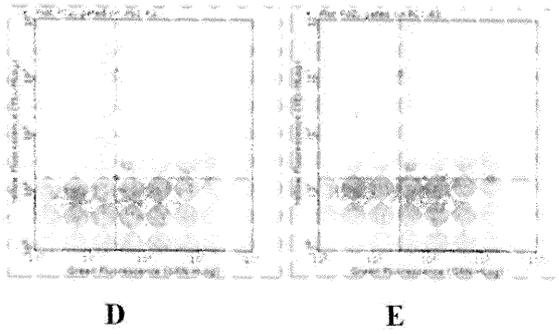
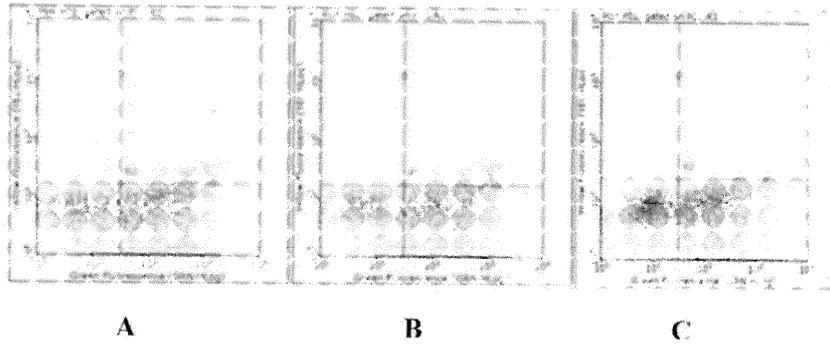
Взвешивание: фиксированная величина

Фиг. 6



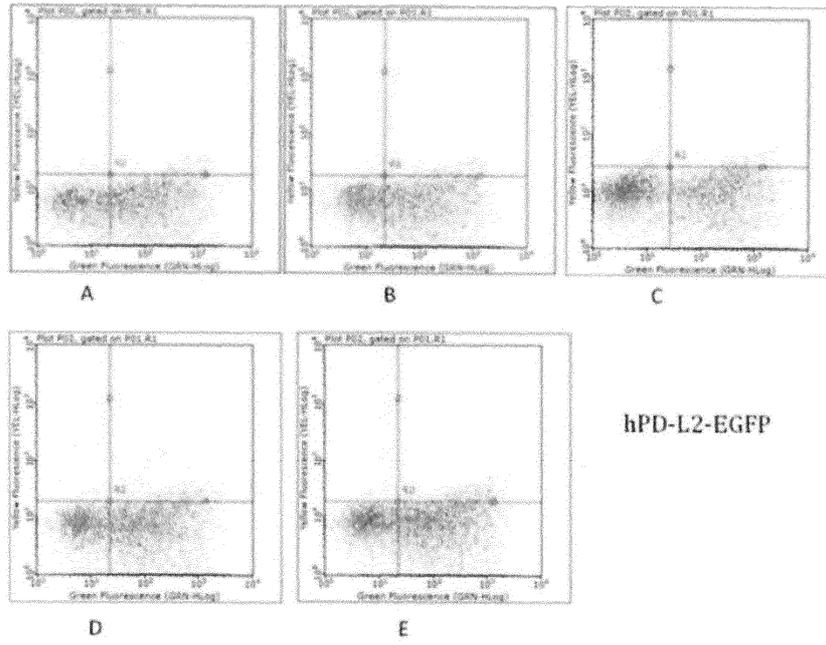
hPD-L1-EGFP

(1)

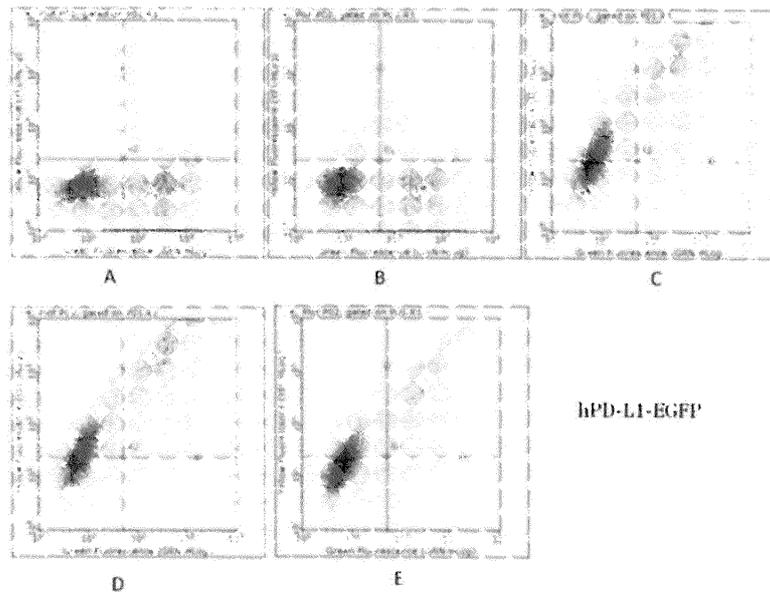


hB7H3-EGFP

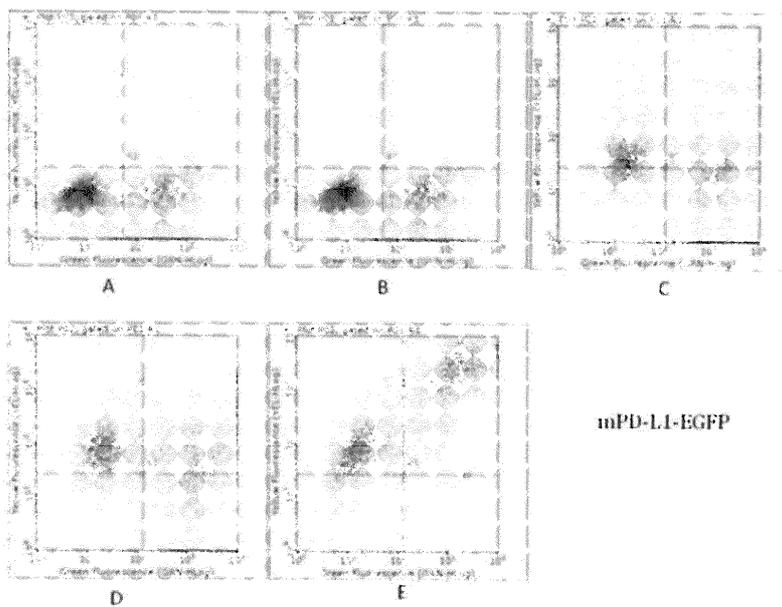
(2)



(3)
Фиг. 7

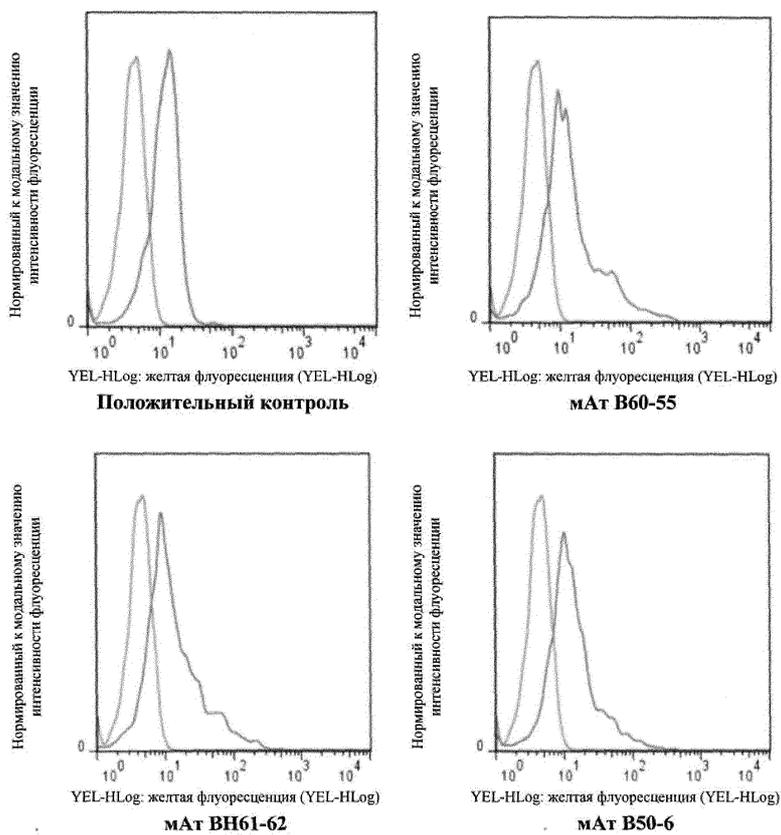


(1)

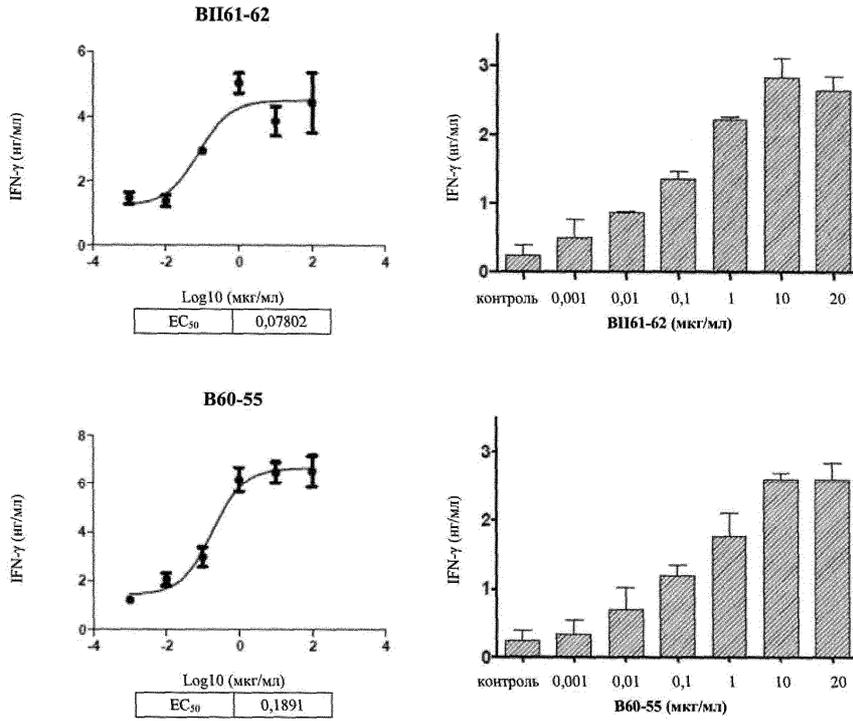


(2)

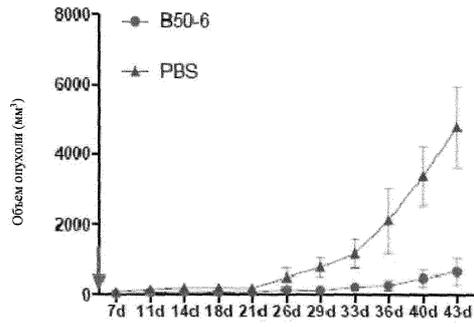
Фиг. 8



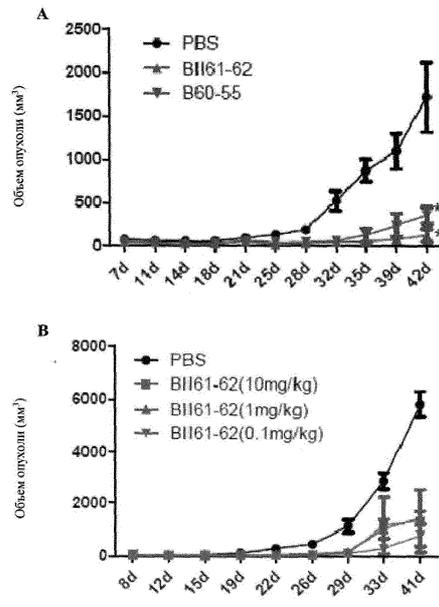
Фиг. 9



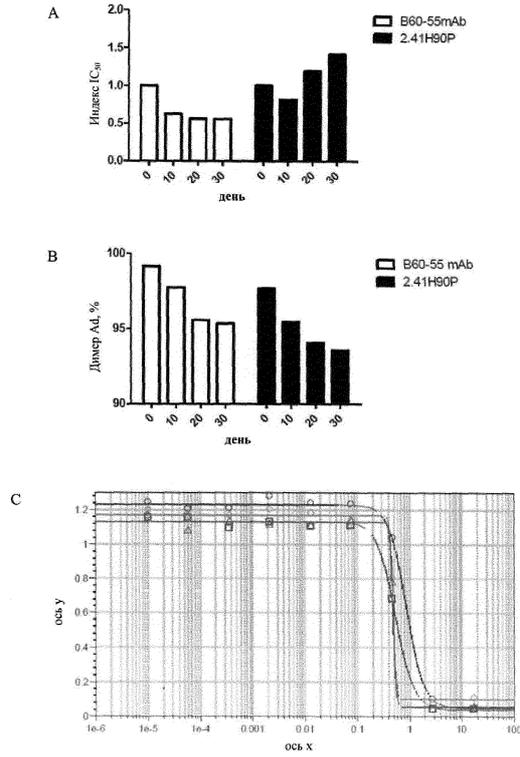
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

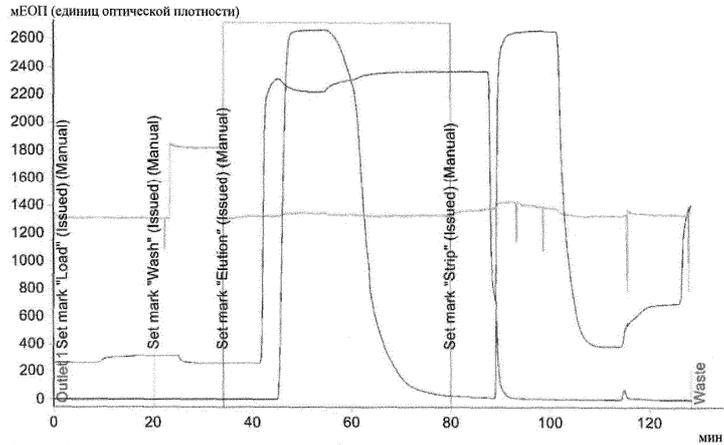


4-P модель, подбор: $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$

	A	B	C	D	R2
○ График №1 (B60-55-10-0d: зависимость показаний от концентрации)	1,23	2,63	0,867	0,0468	0,998
○ График №4 (B60-55-10-30d: зависимость показаний от концентрации)	1,17	15,5	0,484	0,0961	0,997
○ График №3 (B60-55-10-20d: зависимость показаний от концентрации)	1,13	16,1	0,486	0,0537	0,997
○ График №2 (B60-55-10-10d: зависимость показаний от концентрации)	1,13	2,47	0,538	0,363	0,997

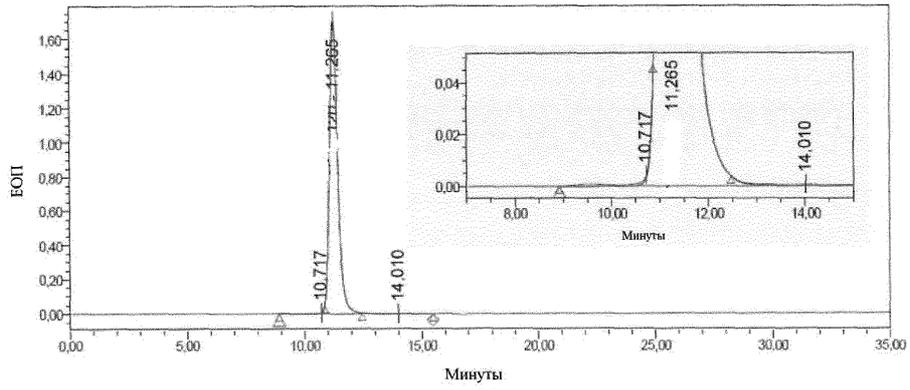
Взвешивание: фиксированная величина

Фиг. 13

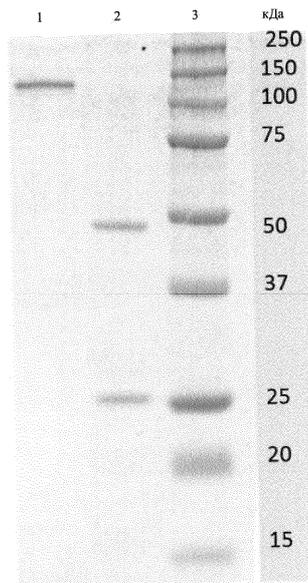


Выход 1 Отметить «Загрузка» (Завершено) (Вручную)
 Отметить «Промывание» (Завершено) (Вручную)
 Отметить «Элюирование» (Завершено) (Вручную)
 Отметить «Снятие» (Завершено) (Вручную)
Смыв

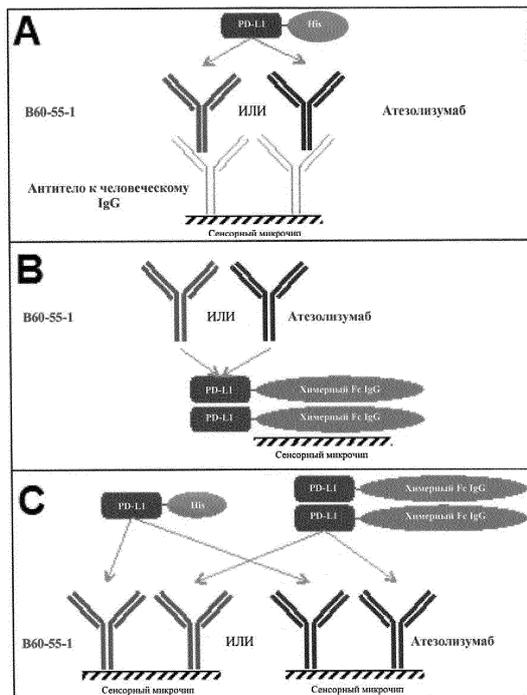
Фиг. 14



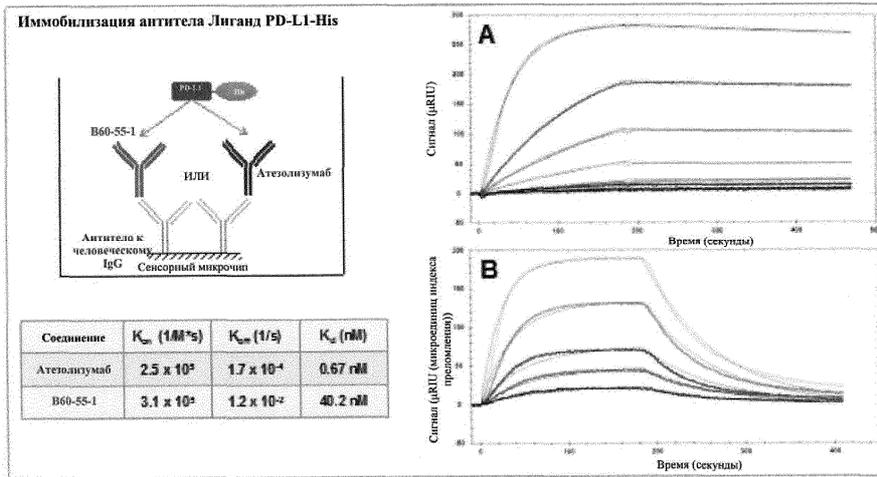
Фиг. 15



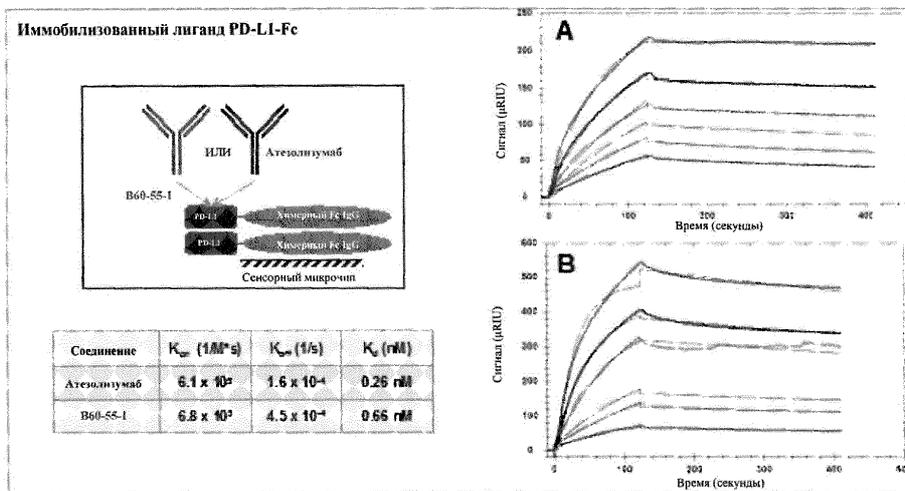
Фиг. 16



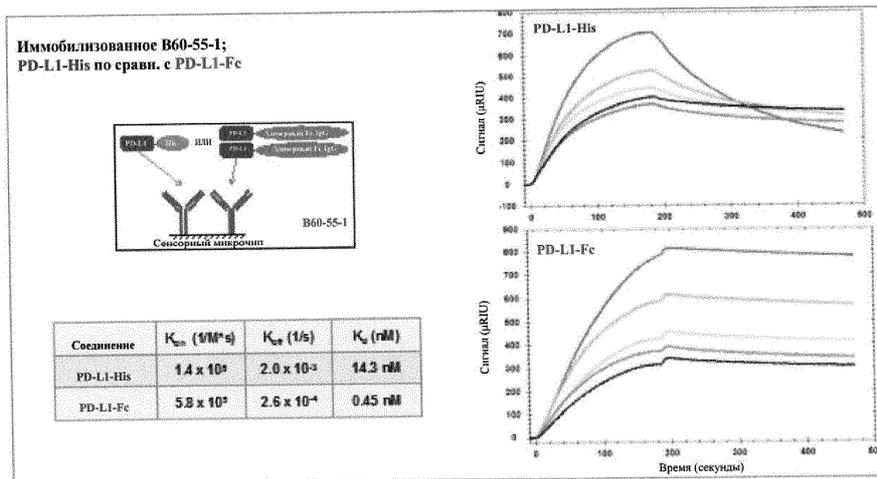
Фиг. 17



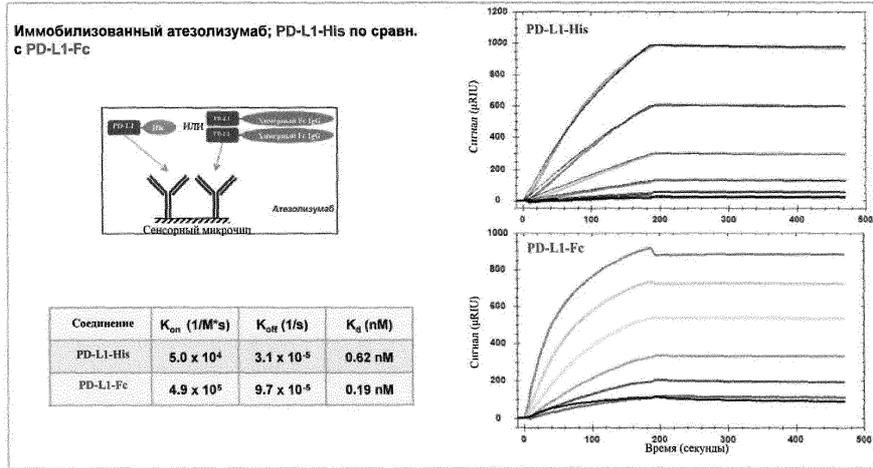
Фиг. 18



Фиг. 19

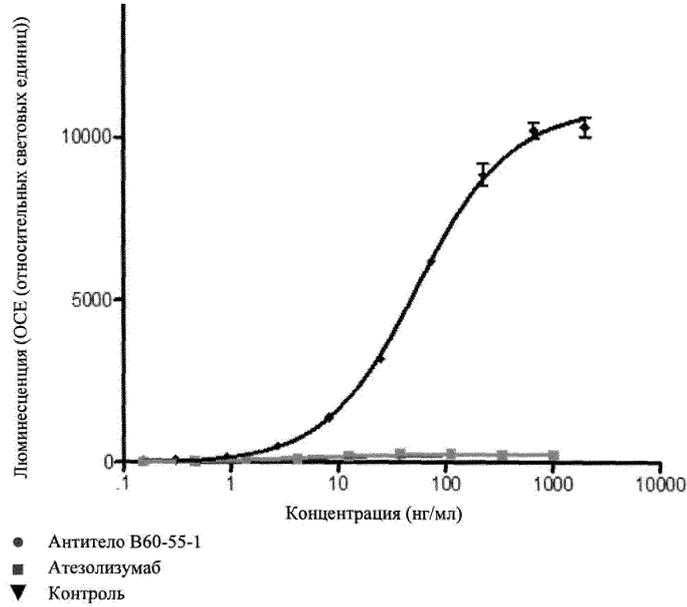


Фиг. 20



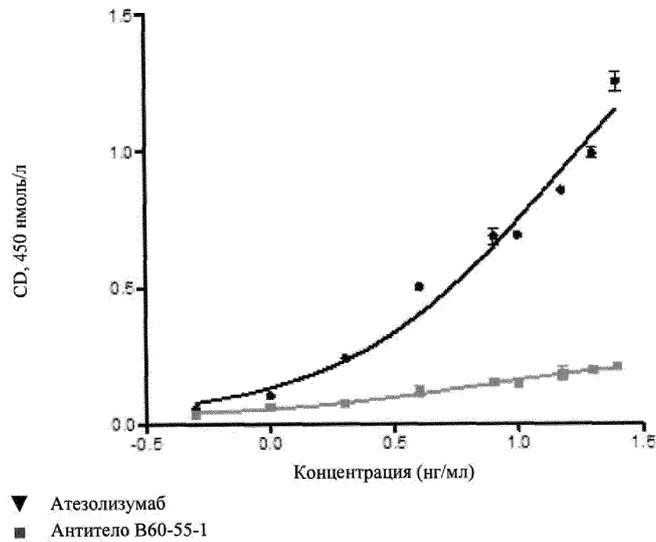
Фиг. 21

Анализ ADCC по гену-репортеру

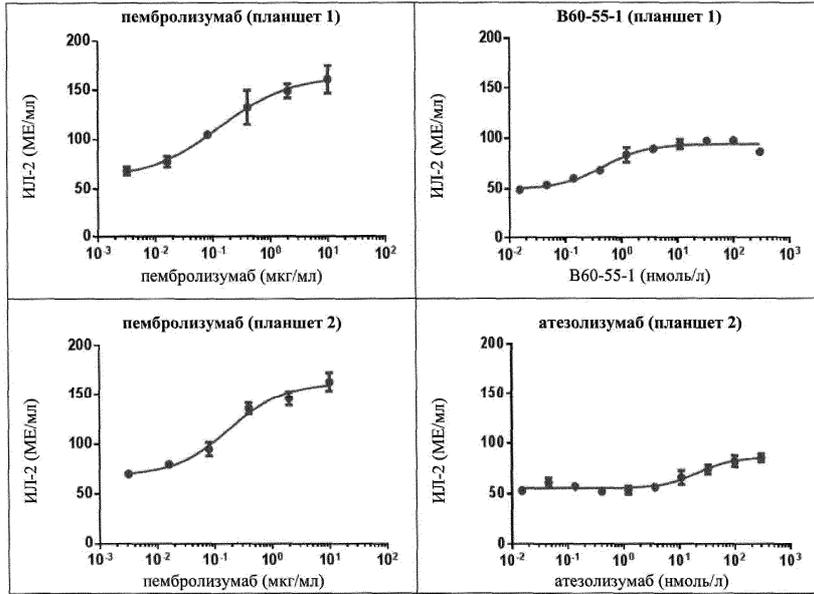


Фиг. 22

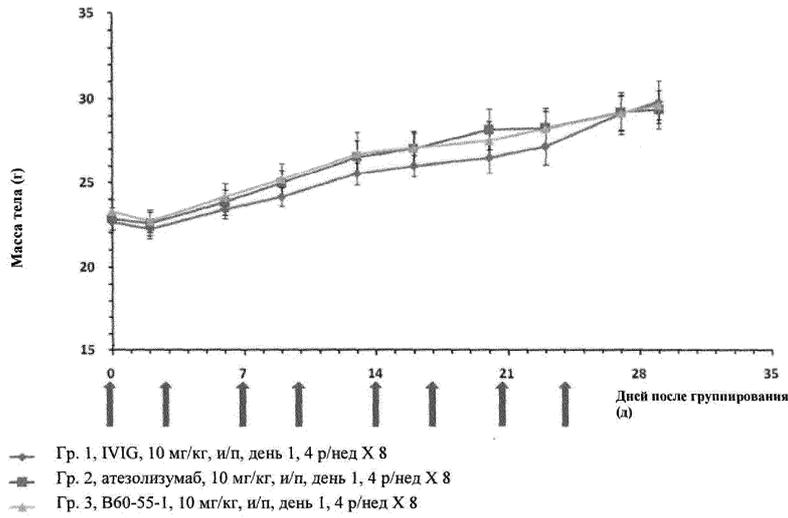
Связывание C1q



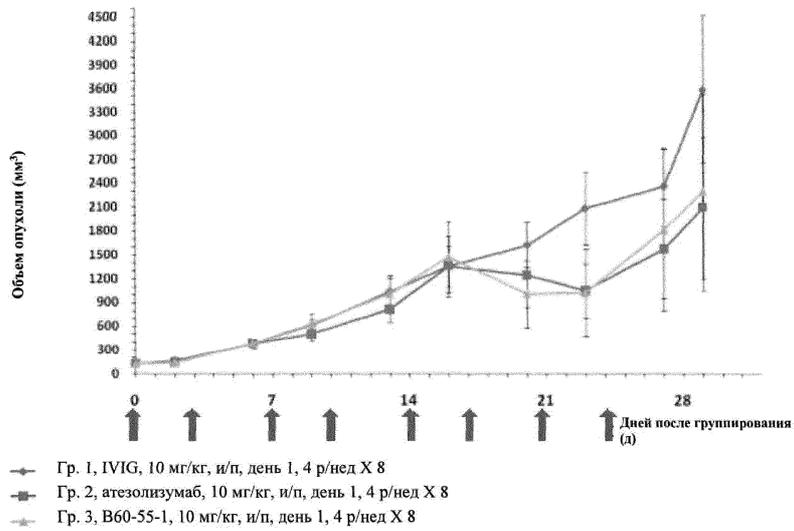
Фиг. 23



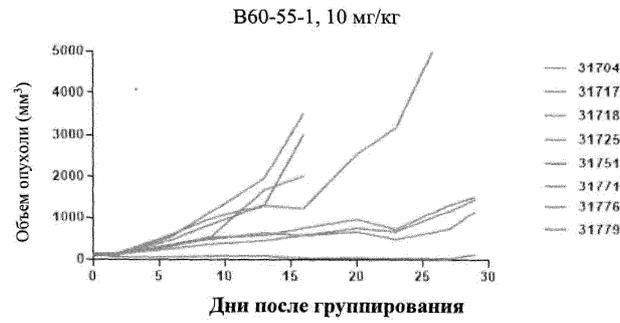
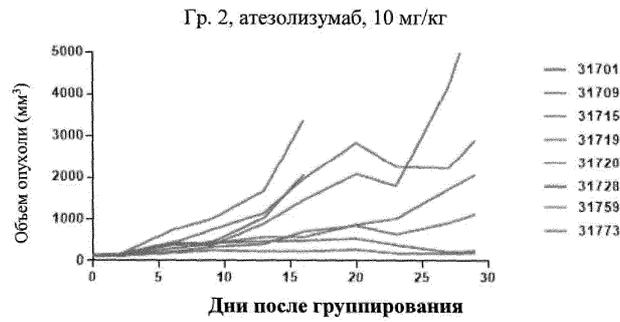
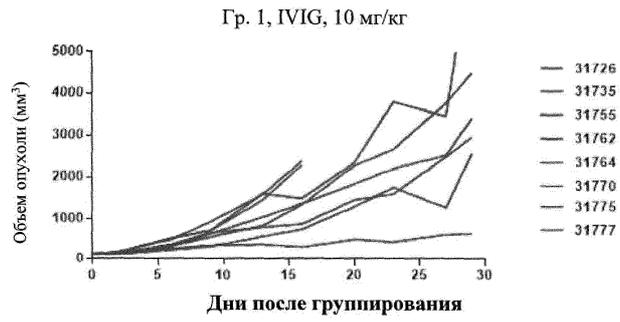
Фиг. 24



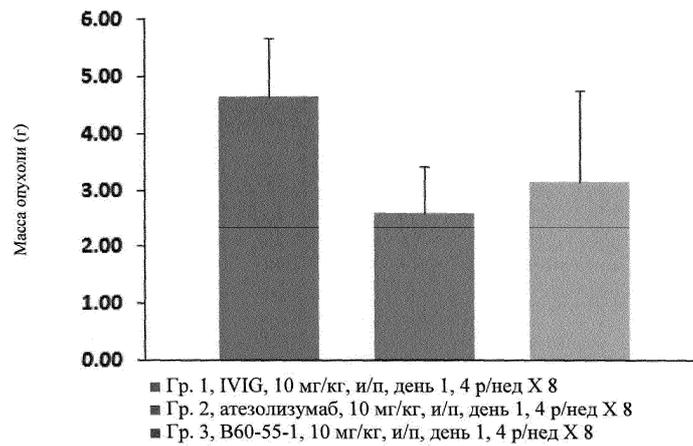
Фиг. 25



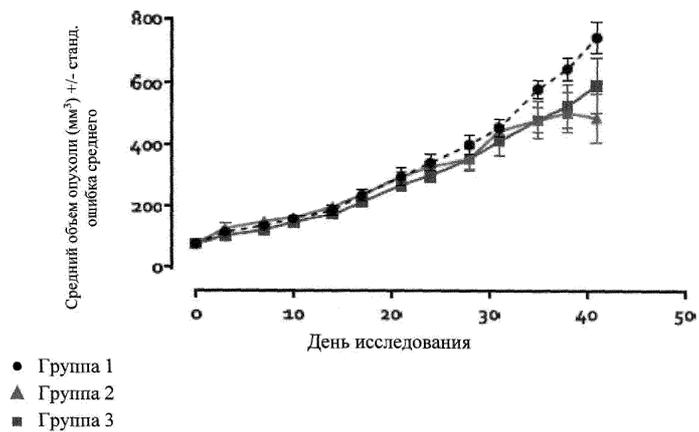
Фиг. 26



Фиг. 27



Фиг. 28



Фиг. 29

