

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390255** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.06.13

(22) Дата подачи заявки
2021.07.27

(51) Int. Cl. *C07K 16/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА PD-L1 И TGF-БЕТА**

(31) PCT/CN2020/105286;
PCT/CN2021/098476

(32) 2020.07.28; 2021.06.04

(33) CN

(86) PCT/CN2021/108643

(87) WO 2022/022503 2022.02.03

(71) Заявитель:
ЛЕПУ БИОФАРМА КО., ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:
Гун Вэньцы, Тоу Ивэй (CN)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Предложены антитела против PD-L1 с превосходной активностью в блокировании взаимодействий PD-1 и PD-L1. Также предложены многофункциональные молекулы, которые включают антитела против PD-L1 или их фрагменты, слитые с внеклеточным доменом TGF-бета-рецептора человека типа 2.

A1

202390255

202390255

A1

БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА PD-L1 И TGF- ВЕТА

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0001] Захватывающие достижения в области иммунотерапии рака в последние годы привели к смене парадигмы в онкологии. Наиболее заметные результаты были получены при терапии на основе Т-клеток, включая ингибиторы иммунных контрольных точек (ICI), генетически модифицированные Т-клетки и биспецифические антитела (BsAb). Т-клетки представляют собой основной класс иммунонадзора и эрадикации опухолей с исключительной специфичностью и долговременной памятью. Однако в микроокружении опухоли Т-клетки могут истощаться, или опухолевые клетки могут быть к ним толерантны. Истощение Т-клеток обычно связано с сверхэкспрессией ингибирующих рецепторов, включая рецептор запрограммированной гибели клеток-1 (PD-1), цитотоксический антиген Т-лимфоцитов-4 (CTLA-4), ген активации лимфоцитов-3 (LAG-3), домен иммуноглобулина Т-клеток и домен муцина-3 (TIM-3), рецептор IL-10 и рецепторы иммуноглобулина-киллера.

[0002] Терапия на основе моноклональных антител (mAb) для противодействия этим молекулам контрольных точек может удалить преграду, которая сдерживает инфильтрирующие опухоль Т-клетки, тем самым достигая значительных клинических преимуществ при различных злокачественных новообразованиях. Например, блокирование взаимодействий PD-1/PD-L1 может улучшить иммунную нормализацию и усилить противораковые ответы. Однако заметный дефицит блокад PD-1/PD-L1 представляет собой несоответствие в однородной исследуемой популяции со схожими характеристиками опухоли. Кроме того, лечение блокадой PD-1/PD-L1 может также вызывать определенные воспалительные побочные эффекты у некоторых пациентов. Ограниченность монотерапии блокадами PD-1/PD-L1 и отсутствие перспективных альтернатив обусловили необходимость поиска комбинированных методов лечения, способных активировать противоопухолевый иммунитет и повысить эффективность лечения.

[0003] M7824 (bintrafusp alfa) представляет собой бифункциональный белок, состоящий из моноклонального антитела против лиганда 1 запрограммированной

гибели клеток (PD-L1), слитого с внеклеточным доменом рецептора II трансформирующего фактора роста человека (TGF-β), который функционирует как «ловушка» для всех трех изоформ TGF-β. Часть PD-L1 основана на авелумабе, который был одобрен для лечения карциномы клеток Меркеля и уротелиального рака. Однако текущие клинические данные показывают, что использование M7824 связано с нежелательным ростом кожи, а общая частота ответа составляла всего от примерно 35 до 40% в исследовании фазы II для пациентов с ВПЧ-положительными злокачественными новообразованиями. Таким образом, необходимы улучшенные виды терапии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Настоящее изобретение относится, в некоторых вариантах реализации, к бифункциональным молекулам, которые нацелены как на белок PD-L1, так и на TGF-β. Раскрытая единица, нацеливающаяся на PD-L1, состоящая из антитела против PD-L1, слита с внеклеточным доменом рецептора II трансформирующего фактора роста-β (TGF-β) человека, который функционирует в качестве ловушки для TGF-β. Экспериментальные данные показывают, что эти новые бифункциональные молекулы более эффективны, чем M7824, ведущий кандидат для клинических разработок.

[0005] Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложена многофункциональная молекула, содержащая антитело против PD-L1 (лиганд запрограммированной гибели клеток 1) или его фрагмент и внеклеточный домен TGF-β RII человека (TGF-бета-рецептор типа 2), при этом антитело против PD-L1 или его фрагмент обладают специфичностью к белку PD-L1 человека и содержат переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, соответственно, содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7-12 или SEQ ID NO:13-18, или при этом CDR1 VH содержит SEQ ID NO:19, CDR2 VH содержит SEQ ID NO:20, 91 или 92, CDR3 VH содержит SEQ ID NO:21, CDR1 VL содержит SEQ ID NO:22, CDR2 VL содержит SEQ ID NO:23 и CDR3 VL содержит SEQ ID NO:24 или 93, при этом внеклеточный домен TGF-β RII человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72 и слит с антителом против PD-L1 или его фрагментом.

[0006] В одном варианте реализации предложено антитело против PD-L1 (лиганд запрограммированной гибели клеток 1) или его фрагмент, которое обладает специфичностью к белку PD-L1 человека и содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, соответственно, содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7-12 или SEQ ID NO:13-18, или при этом CDR1 VH содержит SEQ ID NO:19, CDR2 VH содержит SEQ ID NO:20, 91 или 92, CDR3 VH содержит SEQ ID NO:21, CDR1 VL содержит SEQ ID NO:22, CDR2 VL содержит SEQ ID NO:23 и CDR3 VL содержит SEQ ID NO:24 или 93.

[0007] Также предложена многофункциональная молекула, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, слитые через пептидный линкер с N-концом аминокислотной последовательности SEQ ID NO:72, причем пептидный линкер (a) имеет по меньшей мере 30 аминокислотных остатков в длину или (b) имеет по меньшей мере 25 аминокислотных остатков в длину и содержит мотив альфа-спирали.

[0008] Также предложены применения и способы лечения рака с помощью любой из молекул согласно настоящему изобретению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0009] На **ФИГ. 1** показано, что 47C6A3, 67F3G7 и 89C10H8 могут связываться с PD-L1 человека с высокой аффинностью.

[0010] На **ФИГ. 2** показаны антитела 47C6A3, 67F3G7 и 89C10H8, которые могут эффективно связываться с PD-L1, экспрессируемым на клетках млекопитающих.

[0011] На **ФИГ. 3** показано, что антитела 47C6A3, 67F3G7 и 89C10H8 могут связываться с PD-L1 яванского макака с высокой аффинностью, но не могут связываться с PD-L1 крысы или мыши.

[0012] На **ФИГ. 4** показано, что 47C6A3, 67F3G7 и 89C10H8 могут эффективно ингибировать связывание PD-L1 человека с PD1 человека.

[0013] На **ФИГ. 5** показана кинетика связывания 47C6A3, 67F3G7 и 89C10H8 с рекомбинантным PD-L1.

[0014] На ФИГ. 6А-С показано, что все тестируемые гуманизированные антитела имеют сопоставимую эффективность связывания с PD-L1 человека в качестве химерного антитела.

[0015] На ФИГ. 7 показано, что тестируемые гуманизированные антитела могут высокоэффективно связываться с PD-L1, экспрессируемым на клетках млекопитающих, сопоставимым с химерным антителом.

[0016] На ФИГ. 8А-С показано, что некоторые гуманизированные антитела могут эффективно ингибировать связывание PD-L1 человека с PD1 человека.

[0017] На ФИГ. 9А-С показано, что некоторые гуманизированные антитела могут эффективно ингибировать связывание PD-L1 человека с CD80 человека.

[0018] На ФИГ. 10 показана кинетика связывания LP008-06, LP008-06a, LP008-06a-DA и LP008-06a-ES с рекомбинантным PD-L1 человека.

[0019] На ФИГ. 11 показана кинетика связывания LP008-02 с PD-L1 человека и TGF- β 1 человека.

[0020] На ФИГ. 12 показано, что LP008-02 и LP008-06a-ES могут блокировать взаимодействие PD1 и PD-L1 с более высокой аффинностью, чем M7824.

[0021] На ФИГ. 13 показано, что M7824, LP008-02 и LP008-06a-ES могут эффективно блокировать каноническую передачу сигналов TGF- β .

[0022] На ФИГ. 14 показано, что LP008-02 и LP008-06a-ES связываются с PD-L1 человека с высокой аффинностью.

[0023] На ФИГ. 15 показано, что LP008-02 и LP008-06a-ES могут связываться с PD-L1 яванского макака с более высокой аффинностью, но не могут связываться с PD-L1 крысы или PD-L1 мыши.

[0024] На ФИГ. 16 показано, что LP008-02 и LP008-06a-ES имеют сопоставимую эффективность связывания с TGF- β человека, как M7824.

[0025] На ФИГ. 17 показано, что LP008-02 и LP008-06a-ES имеют сопоставимую эффективность связывания с TGF- β яванского макака, TGF- β мышцы и TGF- β крысы, как M7824.

[0026] На ФИГ. 18А-В показано действие лекарственных средств LP008-02 и LP008-06a-ES на животных моделях.

[0027] На ФИГ. 19 показано, что все протестированные модифицированные бифункциональные молекулы имели сопоставимую эффективность связывания с TGF- β человека, как LP008-02-1.

[0028] На ФИГ. 20 показано, что все протестированные модифицированные бифункциональные молекулы могут эффективно блокировать каноническую передачу сигналов TGF- β .

[0029] На ФИГ. 21 показано, что все протестированные модифицированные бифункциональные молекулы имели сопоставимую эффективность связывания с TGF- β человека, как LP008-02-1.

[0030] На ФИГ. 22 показано, что все протестированные модифицированные бифункциональные молекулы могут эффективно блокировать каноническую передачу сигналов TGF- β .

[0031] На ФИГ. 23 показано, что антитела MPDL3280A, 47C6A3, Hu67F3G7-22 и Hu89C10H8-7 могут блокировать взаимодействие PD1 и PD-L1 с высокой аффинностью.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

[0032] Следует отметить, что термин объекта в единственном числе относится к одному или более таким объектам; например, понимают, что «антитело» представляет одно или более антител. По этой причине термины в единственном числе, термины «один или более» и «по меньшей мере один» можно использовать взаимозаменяемо в данной заявке.

[0033] В контексте настоящей заявки «антитело» или «антигенсвязывающий полипептид» относится к полипептиду или полипептидному комплексу, который специфичным образом распознает антиген и связывается с ним. Антитело может представлять собой целое антитело и любой его антиген-связывающий фрагмент или одну цепь. Таким образом, термин «антитело» включает любой белок или пептид, содержащий молекулу, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, обладающую биологической активностью связывания с антигеном. Их примеры включают, но не ограничены перечисленными: определяющий комплементарность участок (CDR, гипервариабельный участок) тяжелой или легкой цепи или ее связывающую лиганд часть, вариабельную область тяжелой цепи или легкой цепи, константную область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасный (FR) участок, или любую их часть, или по меньшей мере одну часть связывающего белка.

[0034] Термины «фрагмент антитела» или «антиген-связывающий фрагмент» в настоящей заявке представляет собой часть антитела, такую как $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , Fv , $scFv$ и тому подобные части. Независимо от структуры, фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознается интактным антителом. Термин «фрагмент антитела» включает аптамеры, шпигельмеры и диатела. Термин «фрагмент антитела» также включает любой синтетический или генетически модифицированный белок, действующий как антитело, связываясь с определенным антигеном с образованием комплекса.

[0035] Термин «антитело» охватывает различные широкие классы полипептидов, которые являются биохимически различимыми. Специалистам в данной области техники известно, что тяжелые цепи подразделяют на гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon (γ , μ , α , δ , ϵ), среди которых также есть несколько подклассов (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Именно природа этой цепи определяет «класс» антитела как IgG , IgM , IgA IgG или IgE , соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например, IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 , IgG_4 , IgG_5 и т.д., хорошо описаны, и известно, что они придают функциональную специализацию. Модифицированные варианты каждого из данных классов и изотипов легко различит квалифицированный специалист с учетом настоящего описания, и, соответственно, они входят в объем настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов со всей ясностью находятся в пределах объема настоящего изобретения, при этом последующее обсуждение будет большей частью

касаться класса IgG молекул иммуноглобулинов. Что касается IgG, стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи молекулярной массой приблизительно 23000 дальтон и два идентичных полипептида тяжелой цепи молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи, как правило, соединены дисульфидными связями в конфигурацию «Y», где легкие цепи заключают в себе тяжелые цепи, начинающиеся в устье «Y» и продолжающиеся через переменную область.

[0036] Под термином «специфично связывает» или «специфично к», как правило, подразумевают, что антитело связывается с эпитопом посредством антиген-связывающего домена, и что такое связывание подразумевает некоторую комплементарность между антиген-связывающим доменом и эпитопом. В соответствии с данным определением, говорят, что антитело «специфично связывается» с эпитопом, когда оно связывается с этим эпитопом посредством антиген-связывающего домена легче, чем оно будет связываться с произвольным, неродственным эпитопом. Термин «специфичность» используют в настоящей заявке, чтобы оценить относительную аффинность, с которой некоторое антитело связывается с некоторым эпитопом. Например, можно считать, что у антитела «А» большая специфичность к данному эпитопу, чем у антитела «В», или можно сказать, что антитело «А» связывается с эпитопом «С» с большей специфичностью, чем его специфичность к эпитопу «D».

[0037] В настоящей заявке термины «лечить» или «лечение» относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или предупредительным мерам, при которых целью является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства, такого как прогрессирование рака. Полезные или желательные клинические результаты включают, но не ограничены перечисленными: частичное снятие симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т.е., отсутствие ухудшения) состояния заболевания, отсрочивание (задержку проявления) или замедление прогрессирования заболевания, снижение выраженности или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию (либо частичную, либо полную), либо детектируемые, либо недетектируемые. «Лечение» также может означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в отсутствии лечения.

Нуждающиеся в лечении включают тех, у кого уже есть состояние или расстройство, а также тех, которые предрасположены к состоянию или расстройству, или тех, у кого состояние или расстройство необходимо предотвратить.

[0038] Под терминами «субъект», или «индивид», или «животное», или «пациент», или «млекопитающее» подразумевают любого субъекта, особенно млекопитающего субъекта, для которого желательна диагностика, прогнозирование или терапия. Субъекты-млекопитающие включают людей, одомашненных животных, сельскохозяйственных животных и животных зоопарка, животных, принимающих участие в спорте, или домашних животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и так далее.

[0039] В контексте настоящей заявки такие фразы, как «нуждающемуся в лечении пациенту» или «нуждающийся в лечении субъект», включают субъектов, таких как субъекты-млекопитающие, которые получили бы пользу от введения антитела или композиции согласно настоящему изобретению при применении, например, для обнаружения, для процедуры диагностики и/или для лечения.

Многофункциональные молекулы

[0040] Как продемонстрировано в прилагаемых экспериментальных примерах, авторы настоящего изобретения смогли идентифицировать ряд бифункциональных гибридных белков, которые включают фрагмент против PD-L1 и фрагмент, нацеленный на TGF- β . Как показано в Примере 14, например, оба протестированных бифункциональных белка, LP008-02 и LP008-06a-ES, продемонстрировали большую эффективность, чем M7824, на мышинной модели MC38. M7824 представляет собой слитый белок PD-L1/TGF- β с двойным нацеливанием, в настоящее время находящийся в фазе II клинических испытаний для пациентов с ВПЧ-положительными злокачественными новообразованиями. Фрагмент PD-L1 M7824 основан на авелумабе, который является ведущим антителом против PD-L1 и был одобрен для лечения карциномы клеток Меркеля и уротелиального рака. Поэтому превосходная эффективность недавно раскрытых бифункциональных белков, по сравнению с M7824, вызывает удивление.

[0041] Кроме того, как показано в Примере 12, описанные в настоящем документе бифункциональные белки обладают лучшей видовой специфичностью. В отличие от

M7824, который также реагирует с PD-L1 мыши и крысы, новые бифункциональные белки связываются только с PD-L1 человека и яванского макака, в дополнение к его превосходной активности связывания PD-L1.

[0042] Таким образом, в одном варианте реализации настоящего изобретения предложена многофункциональная молекула, имеющая по меньшей мере фрагмент против PD-L1 и фрагмент, нацеленный на TGF- β . Фрагмент против PD-L1 может включать антитело против PD-L1 или фрагмент согласно настоящему изобретению. Фрагмент, нацеленный на TGF- β , предпочтительно представляет собой внеклеточный домен рецептора II трансформирующего фактора роста человека- β (TGF- β) (TGF- β RII или TGFBR2).

[0043] TGF- β RII имеет две изоформы. Изоформа A (NP_001020018.1; SEQ ID NO:70) имеет более длинный внеклеточный фрагмент, чем изоформа B (NP_003233.4; SEQ ID NO:71), но они имеют один и тот же коровый эктодомен (SEQ ID NO:72). Их последовательности приведены в Таблице A ниже.

Таблица A. Последовательности, связанные с TGF- β RII (подчеркнуто и выделено жирным шрифтом: коровый эктодомен; подчеркнуто и выделено курсивом: различные остатки между изоформами; только подчеркнуто: мутации)

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
Изоформа A TGFBR2	MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRT <u>AHPLRHINNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFVFSTCDNQKSCMSNCSITS</u> <u>ICEKQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKIMKE</u> <u>KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFS</u> EEYNTSNPDLLLIVIFQVTGISLLPP LGVAISVIIIFCYRVNRQQKLSSTWETGKTRKLMFSEHCAIILEDTRS DISSTCANNINHNTELLPIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVA VKIFPYEYASWKTEKDIFSDINLKHENILQFLTAEERKTELGKQYWLIT AFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSLARGIAHLHSDHTPCGRPKMPI VHRDLKSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANSQQVGTARYM APEVLESRMNLENVESFKQTDVYSMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPFPG SKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSWLHNHQIQMVCETLTECWDHDP EARLTAQCVAERFSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNTTK	70
Изоформа B TGFBR2	MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSYNNDMIVTDNNGAVKFP <u>QL</u> <u>CKFCDFVFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKQEVCVAVWRKNDENITLETV</u> <u>CHDPKLPYHDFILEDAASPKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFS</u> EEYNTSNPDLLLIVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIFCYRVNRQQKLSST WETGKTRKLMFSEHCAIILEDTRSDISSTCANNINHNTELLPIELDTLV GKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVAVKIFPYEYASWKTEKDIFSDINLK HENILQFLTAEERKTELGKQYWLITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLG SSLARGIAHLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSNILVKNDLTCCLCDFGL	71

	SLRLDPTLSVDDLANSQVGTARYMAPEVLESRMNLENVESFKQTDVYSM ALVWLWEMTSRCNAVGEVKDYEPFPGSKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPEI PSFWLNHQGIQMV CETL TECWDHDPEARLTAQCVAERFSELEHLDRLSGR SCSEKIPEDGSLNTTK	
Эктодомен	QLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL TVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCS CSSSDECNDNII FS	72
Вариант 1 (более длинный внеклеточный фрагмент)	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSI</u> <u>TSICEKPQEVCAVWRKNDENITLTVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIM</u> <u>KEKKKPGETFFMCS CSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD</u>	61
Вариант 2 (N-концевое усечение 25 аминокислот из варианта 1)	<u>QLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL</u> <u>TVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCS CSSSDECNDNII</u> <u>FSEEYNTSNPD</u>	73
Вариант 3 (удаление потенциальных сайтов гликозилирования из варианта 1)	<u>IPPHVQXXVNNDMIVTDNXGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSI</u> <u>TSICEKPQEVCAVWRKNDENITLTVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIM</u> <u>KEKKKPGETFFMCS CSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD</u>	74
Вариант 4 (замена более длинных пептидов)	<u>TAGHTQTS TGGGAI TTGTSGAGHGPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSI</u> <u>TSICEKPQEVCAVWRKNDENITLTVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIM</u> <u>KEKKKPGETFFMCS CSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD</u>	75
Вариант 5 (замена более длинных пептидов и C-концевая делеция)	<u>TAGHTQTS TGGGAI TTGTSGAGHGPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSI</u> <u>TSICEKPQEVCAVWRKNDENITLTVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIM</u> <u>KEKKKPGETFFMCS CSSSDECNDNIIFS</u>	76
Вариант 6 (замена более коротких пептидов и C-концевая делеция)	<u>HYPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENI</u> <u>TLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCS CSSSDECND</u> <u>NIIFS</u>	77
Вариант 7 (замена более коротких пептидов)	<u>HYPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENI</u> <u>TLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCS CSSSDECND</u> <u>NIIFSEEYNTSNPD</u>	78
Замена N-концевого фрагмента варианта 3	IPPHVQXXVNNDMIVTDNXGAVKFP	88

[0044] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TGF- β RII включает коровий эктодомен (SEQ ID NO:72), а также некоторые фланкирующие остатки. Например, вариант 1 (SEQ ID NO:61), который был протестирован в Примерах 8-16, включает дополнительные 25 остатков на N-конце и девять на C-конце. Другой вариант, вариант 2 (SEQ ID NO:73), включает только девять C-концевых фланкирующих остатков. Другие варианты, такие как варианты 4-7 (SEQ ID NO:75-78), включают альтернативные линкеры, заменяющие часть N-концевых последовательностей SEQ ID NO:61.

[0045] В некоторых вариантах реализации внеклеточный домен TGF- β RII не содержит первые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25

аминокислот SEQ ID NO:61. В некоторых вариантах реализации внеклеточный домен TGF- β RII не содержит последние 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 аминокислот SEQ ID NO:61.

[0046] Еще один вариант, вариант 3, основан на варианте 1, но включает по меньшей мере замену аминокислоты в положениях X в N-концевой части (SEQ ID NO:88). Эти положения X являются потенциальными сайтами гликозилирования. Таким образом, замена представляет собой замену на аминокислоту, отличную от K, S и N. Примеры замен представляют собой R, A, G, Q, I, L, D или E, без ограничения.

[0047] Фрагмент против PD-L1, согласно некоторым вариантам реализации, состоит из антитела против PD-L1 или его фрагмента, как дополнительно описано ниже. Антитело или фрагмент могут принимать любой формат антитела, такой как обычный полный формат IgG, Fab-фрагмент, одноцепочечный фрагмент или однодоменное антитело, без ограничения. Когда антитело или его фрагмент содержит легкую цепь и отдельную тяжелую цепь, внеклеточный домен TGF- β RII может быть слит либо с легкой цепью, либо с тяжелой цепью. Когда антитело или его фрагмент имеют легкую цепь и тяжелую цепь на одной белковой цепи (например, scFv), внеклеточный домен TGF- β RII может быть слит, чтобы быть ближе либо к легкой цепи, либо к тяжелой цепи.

[0048] Согласно некоторым вариантам реализации внеклеточный домен TGF- β RII слит с N-концом цепи фрагмента против PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации внеклеточный домен TGF- β RII слит с C-концом цепи фрагмента против PD-L1. Согласно предпочтительному варианту реализации внеклеточный домен TGF- β RII сливаются с C-концом тяжелой цепи фрагмента против PD-L1, необязательно посредством пептидного линкера (например, SEQ ID NO:60 или один, два или три GGGGS (SEQ ID NO:86) повторяются).

[0049] В некоторых вариантах реализации фрагмент против PD-L1 содержит VH (вариабельную область тяжелой цепи) и VL (вариабельную область легкой цепи). Области VH и VL включают CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, такие как показанные в Таблицах 1A-1C.

[0050] Согласно одному варианту реализации CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL содержат последовательности SDYAWN (SEQ ID NO:7), YIIYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO:8), STMIATNWFAY (SEQ ID NO:9), KASQDVSLAVA (SEQ ID NO:10), WASTRHT (SEQ ID NO:11) и QQHYITPWT (SEQ

ID NO:12), соответственно. Примеры таких последовательностей VH представлены в SEQ ID NO:25 (мышь) и 26-28 (гуманизированные). Примеры таких последовательностей VL представлены в SEQ ID NO:29 (мышь) и 30 (гуманизированные). Примеры гуманизированных антител включают антитела, имеющие VH SEQ ID NO:26, или 27, или 28, и VL SEQ ID NO:30.

[0051] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL содержат последовательности DFWVS (SEQ ID NO:13), EIYPNSGVSRVNEKFKG (SEQ ID NO:14), YFGYTYWFGY (SEQ ID NO:15), RASKSVSTYMH (SEQ ID NO:16), SASHLES (SEQ ID NO:17) и QQSNELPVT (SEQ ID NO:18), соответственно. Примеры таких последовательностей VH представлены в SEQ ID NO:31 (мышь) и 32-37 (гуманизированные). Примеры таких последовательностей VL представлены в SEQ ID NO:38 (мышь) и 39-43 (гуманизированные). Примеры гуманизированных антител включают антитела, имеющие VH с последовательностью SEQ ID NO:34 и VL с последовательностью SEQ ID NO:39, 40 или 43, имеющие VH с последовательностью SEQ ID NO:35 и VL с последовательностью SEQ ID NO:39 или имеющие VH с последовательностью SEQ ID NO:37 и VL с последовательностью SEQ ID NO:39. Согласно одному варианту реализации гуманизированное антитело содержит VH с последовательностью SEQ ID NO:34 и VL с последовательностью SEQ ID NO:43.

[0052] В одном варианте реализации CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL содержат последовательности NYWMT (SEQ ID NO:19), SITNTGSSTFYPSVKG (SEQ ID NO:20), DTTIAPFDY (SEQ ID NO:21), KASQNLNEYLN (SEQ ID NO:22), KTNTLQA (SEQ ID NO:23) и SQYNSGNT (SEQ ID NO:24), соответственно. Альтернативно, CDR2 VH может включать SITNTGSSTFYPSVKG (SEQ ID NO:91) или SITNTGSSTFYPSVKG (SEQ ID NO:92). Альтернативно, VL CDR3 может представлять собой SQYQSGNT (SEQ ID NO:93).

[0053] В одном варианте реализации CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL содержат последовательности NYWMT (SEQ ID NO:19), SITNTGSSTFYPSVKG (SEQ ID NO:20), DTTIAPFDY (SEQ ID NO:21), KASQNLNEYLN (SEQ ID NO:22), KTNTLQA (SEQ ID NO:23) и SQYNSGNT (SEQ ID NO:24), соответственно. В одном варианте реализации CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3

VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL содержат последовательности NYWMT (SEQ ID NO:19), SITNTGSSTFYPPDAVKG (SEQ ID NO:91), DTIAPFDY (SEQ ID NO:21), KASQNLNEYLN (SEQ ID NO:22), KTNTLQA (SEQ ID NO:23) и SQYNSGNT (SEQ ID NO:24), соответственно. В одном варианте реализации CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL содержат последовательности NYWMT (SEQ ID NO:19), SITNTGSSTFYPPESVKG (SEQ ID NO:92), DTIAPFDY (SEQ ID NO:21), KASQNLNEYLN (SEQ ID NO:22), KTNTLQA (SEQ ID NO:23) и SQYNSGNT (SEQ ID NO:24), соответственно.

[0054] В одном варианте реализации CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL содержат последовательности NYWMT (SEQ ID NO:19), SITNTGSSTFYPPDSVKG (SEQ ID NO:20), DTIAPFDY (SEQ ID NO:21), KASQNLNEYLN (SEQ ID NO:22), KTNTLQA (SEQ ID NO:23) и SQYQSGNT (SEQ ID NO:93), соответственно. В одном варианте реализации CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL содержат последовательности NYWMT (SEQ ID NO:19), SITNTGSSTFYPPDAVKG (SEQ ID NO:91), DTIAPFDY (SEQ ID NO:21), KASQNLNEYLN (SEQ ID NO:22), KTNTLQA (SEQ ID NO:23) и SQYQSGNT (SEQ ID NO:93), соответственно. В одном варианте реализации CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL содержат последовательности NYWMT (SEQ ID NO:19), SITNTGSSTFYPPESVKG (SEQ ID NO:92), DTIAPFDY (SEQ ID NO:21), KASQNLNEYLN (SEQ ID NO:22), KTNTLQA (SEQ ID NO:23) и SQYQSGNT (SEQ ID NO:93), соответственно.

[0055] Примеры таких последовательностей VH представлены в SEQ ID NO:44 (мышь) и 45-49 (гуманизированные) и 57-58 (гуманизированные). Примеры таких последовательностей VL представлены в SEQ ID NO:50 (мышь) и 51-55 (гуманизированные) и 56 (гуманизированные).

[0056] Примеры гуманизированных антител включают антитела, имеющие VH с последовательностью SEQ ID NO:49 и VL с последовательностью SEQ ID NO:52 или 54, или имеющие VH с последовательностью SEQ ID NO:48 и VL с последовательностью SEQ ID NO:53 или 54. Согласно одному варианту реализации гуманизированное антитело содержит VH с последовательностью SEQ ID NO:48 и VL с последовательностью SEQ ID NO:53. Согласно одному варианту реализации гуманизированное антитело содержит VH с последовательностью SEQ ID NO:48 и VL

с последовательностью SEQ ID NO:56. Согласно одному варианту реализации гуманизованное антитело содержит VH с последовательностью SEQ ID NO:57 и VL с последовательностью SEQ ID NO:56. Согласно одному варианту реализации гуманизованное антитело содержит VH с последовательностью SEQ ID NO:58 и VL с последовательностью SEQ ID NO:56.

[0057] В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент дополнительно содержат константную область тяжелой цепи (например, CH1, CH2 и/или CH3) и/или константную область легкой цепи (например, CL). Пример константной области тяжелой цепи представлен в SEQ ID NO:59, и пример константной области легкой цепи представлен в SEQ ID NO:67 (остатки 108-214).

Слияния TGF- β RII и антитела

[0058] Тестирование с различными конструкциями гибридных белков (*например*, таблица 15) продемонстрировало, что для активности требуется только коровый эктодомен (SEQ ID NO:72) TGF- β RII. Кроме того, внеклеточный домен TGF- β RII не следует непосредственно сливать с антителом. Должно быть достаточное расстояние, обеспечиваемое пептидным линкером.

[0059] Что касается эктодомена, то пептидный линкер (который может быть полностью искусственным линкером или включать часть внеклеточного фрагмента N-конца к эктодомену, SEQ ID NO:89) должен иметь минимальную длину. Если расстояние является слишком коротким, слитый белок снижает стабильность или активность. Минимальная длина, в некоторых вариантах реализации, составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения линкер содержит не более 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 170 или 200 аминокислотных остатков.

[0060] Включение гибкого линкера, *например*, одного или более фрагментов G4S (SEQ ID NO:86) и, в некоторых вариантах реализации, может быть полезным для стабильности и/или активности многофункциональной молекулы. В некоторых вариантах реализации гибкий линкер содержит по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70%

или 80% глицина. В некоторых вариантах реализации гибкий линкер включает один или более серин. В некоторых вариантах реализации гибкий линкер содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 повторов G4S (SEQ ID NO:86).

[0061] Показано, что (например, Пример 17), в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, природный N-концевой фрагмент (IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP; SEQ ID NO:89) может быть заменен на замещающий пептид для повышения стабильности, без потери или даже с улучшением активности. В некоторых вариантах осуществления замещающий пептид отличается от SEQ ID NO:89, но обладает по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO:89.

[0062] Примером замещающего пептида является IPPHVQXXVNNDMIVTDNXGAVKFP (SEQ ID NO:88), где X представляет собой любую аминокислоту, кроме K, S или N. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения замены могут быть сделаны для удаления жесткого дипептида PP, удаления потенциальных сайтов расщепления QK, N и/или K, включают несколько остатков глицина для повышения гибкости и/или уменьшения гидрофобных остатков. Один из таких примеров представляет собой TAGHTQTSTGGGAIITGTSGAGHG (SEQ ID NO:87) или вариант, имеющий по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:87. В некоторых вариантах реализации указанный вариант включает по меньшей мере 4 G, не включает PP-дипептид, включает не более 3 гидрофобных аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из I, L, M, F, V, W, Y и P. В некоторых вариантах реализации указанный вариант включает по меньшей мере 5 G и не более 1 гидрофобного аминокислотного остатка, выбранного из группы, состоящей из I, L, M, F, V, W, Y и P.

[0063] Согласно некоторым вариантам реализации пептидный линкер между антителом или его фрагментом и эктодоменом (SEQ ID NO:72) TGF- β RII содержит гибкий линкер. В некоторых вариантах реализации пептидный линкер содержит замещающий пептид с SEQ ID NO:89. В некоторых вариантах реализации пептидный линкер включает как гибкий линкер, так и замещающий пептид. В некоторых вариантах реализации гибкий линкер является N-концевым по отношению к

замещающему пептиду. В некоторых вариантах реализации гибкий линкер является С-концевым по отношению к замещающему пептиду.

[0064] В некоторых вариантах осуществления многофункциональная молекула по меньшей мере не включает всю последовательность EEYNTSNPD (SEQ ID NO:90). Многофункциональная молекула может содержать всю SEQ ID NO:90, удаленную из внеклеточного домена TGF- β RII. В некоторых вариантах осуществления многофункциональная молекула не содержит более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных остатков EEYNTSNPD (SEQ ID NO:90).

[0065] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент многофункциональной молекулы может быть нацелено на любой антиген. Неограничивающие примеры представляют собой PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3, CD28, CD122, 4-1BB, TIM3, OX-40, OX40L, CD40, CD40L, LIGHT, ICOS, ICOSL, GITR, GITRL, TIGIT, CD27, VISTA, V7H3, V7H4, BTLA, CD4, CD2, CD8, CD47 и CD73. Они также могут представлять собой любые антитела или фрагменты, раскрытые в настоящей заявке.

[0066] Эктодомен TGF- β RII может быть слит с любой частью антитела или фрагментом. В некоторых вариантах реализации эктодомен слит с С-концом тяжелой цепи или легкой цепи антитела или фрагмента. В некоторых вариантах реализации эктодомен слит с С-концом Fc-фрагмента антитела или фрагмента.

Антитела и фрагменты против PD-L1

[0067] Также предложены антитела и фрагменты против PD-L1, которые могут быть использованы в качестве фрагмента против PD-L1 в многофункциональной молекуле, би- или мультиспецифическом антителе или отдельно в моноспецифическом антителе.

[0068] Примеры мышинных антител против PD-L1 и их гуманизированные и улучшенные антитела были получены и протестированы в сопровождающих экспериментальных примерах. Все мышинные антитела (47C6A3, 67F3G7 и 89C10H8) и их эквивалентные гуманизированные версии демонстрировали превосходную аффинность связывания, перекрестную реактивность и эффективность в ингибировании связывания PD-1/PD-L1.

[0069] Важно отметить, что по сравнению с MPDL3280A (атезолизумаб), гуманизированные 67F3G7 и 89C10H8 проявляли более высокую активность, чем MPDL3280A, при блокировании взаимодействия между PD-1 и PD-L1 (см., например, Пример 18). Кроме того, интересно, что все протестированные антитела согласно настоящему изобретению проявляли меньшую гидрофобность и меньшую вязкость, чем MPDL3280A. Известно, что более высокая гидрофобность снижает растворимость белка. Аналогичным образом, высокая вязкость также является препятствием для разработки высококонцентрированного белкового состава. Таким образом, такие данные демонстрируют, что настоящие антитела лучше подходят для получения высококонцентрированных составов антител.

[0070] Кроме того, антигенсвязывающие фрагменты раскрытых в настоящей заявке антител были включены в качестве фрагмента в бифункциональные слитые белки, которые также включали фрагмент, нацеленный на TGF- β . Полученные бифункциональные слитые белки продемонстрировали большую эффективность, чем M7824 на мышинной модели MC38. M7824 представляет собой слитый белок PD-L1/TGF- β с двойным нацеливанием, в настоящее время находящийся в фазе II клинических испытаний для пациентов с ВПЧ-положительными злокачественными новообразованиями. Фрагмент PD-L1 M7824 основан на авелумабе, который является ведущим антителом против PD-L1 и был одобрен для лечения карциномы клеток Меркеля и уротелиального рака. Эти данные, таким образом, демонстрируют уникальные преимущества раскрытых в настоящей заявке антител при получении би- или многофункциональных молекул.

[0071] В некоторых вариантах реализации антитело или фрагмент против PD-L1 содержит VH (вариабельную область тяжелой цепи) и VL (вариабельную область легкой цепи). Области VH и VL включают CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, такие как показанные в Таблицах 1A-1C.

[0072] Согласно одному варианту реализации CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL содержат последовательности SDYAWN (SEQ ID NO:7), YIIYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO:8), STMIATNWFAY (SEQ ID NO:9), KASQDVSLAVA (SEQ ID NO:10), WASTRHT (SEQ ID NO:11) и QQHYITPWT (SEQ ID NO:12), соответственно. Примеры таких последовательностей VH представлены в SEQ ID NO:25 (мышь) и 26-28 (гуманизированные). Примеры таких

последовательностей VL представлены в SEQ ID NO:29 (мышь) и 30 (гуманизированные). Примеры гуманизированных антител включают антитела, имеющие VH SEQ ID NO:26, или 27, или 28, и VL SEQ ID NO:30.

[0073] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL содержат последовательности DFWVS (SEQ ID NO:13), EIYPNSGVSRVNEKFKG (SEQ ID NO:14), YFGYTYWFGY (SEQ ID NO:15), RASKSVSTYMH (SEQ ID NO:16), SASHLES (SEQ ID NO:17) и QQSNELPVT (SEQ ID NO:18), соответственно. Примеры таких последовательностей VH представлены в SEQ ID NO:31 (мышь) и 32-37 (гуманизированные). Примеры таких последовательностей VL представлены в SEQ ID NO:38 (мышь) и 39-43 (гуманизированные). Примеры гуманизированных антител включают антитела, имеющие VH с последовательностью SEQ ID NO:34 и VL с последовательностью SEQ ID NO:39, 40 или 43, имеющие VH с последовательностью SEQ ID NO:35 и VL с последовательностью SEQ ID NO:39 или имеющие VH с последовательностью SEQ ID NO:37 и VL с последовательностью SEQ ID NO:39. Согласно одному варианту реализации гуманизированное антитело содержит VH с последовательностью SEQ ID NO:34 и VL с последовательностью SEQ ID NO:43.

[0074] В одном варианте реализации CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL содержат последовательности NYWMT (SEQ ID NO:19), SITNTGSSTFYPSVKG (SEQ ID NO:20), DTTIAPFDY (SEQ ID NO:21), KASQNLNEYLN (SEQ ID NO:22), KTNTLQA (SEQ ID NO:23) и SQYNSGNT (SEQ ID NO:24), соответственно. Альтернативно, CDR2 VH может включать SITNTGSSTFYPSVKG (SEQ ID NO:91) или SITNTGSSTFYPSVKG (SEQ ID NO:92). Альтернативно, VL CDR3 может представлять собой SQYQSGNT (SEQ ID NO:93).

[0075] В одном варианте реализации CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL содержат последовательности NYWMT (SEQ ID NO:19), SITNTGSSTFYPSVKG (SEQ ID NO:20), DTTIAPFDY (SEQ ID NO:21), KASQNLNEYLN (SEQ ID NO:22), KTNTLQA (SEQ ID NO:23) и SQYNSGNT (SEQ ID NO:24), соответственно. В одном варианте реализации CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL содержат последовательности NYWMT (SEQ ID NO:19), SITNTGSSTFYPSVKG (SEQ ID NO:91), DTTIAPFDY (SEQ ID NO:21),

KASQNLNEYLN (SEQ ID NO:22), KTNTLQA (SEQ ID NO:23) и SQYNSGNT (SEQ ID NO:24), соответственно. В одном варианте реализации CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL содержат последовательности NYWMT (SEQ ID NO:19), SITNTGSSTFYPPESVKG (SEQ ID NO:92), DTIAPFDY (SEQ ID NO:21), KASQNLNEYLN (SEQ ID NO:22), KTNTLQA (SEQ ID NO:23) и SQYNSGNT (SEQ ID NO:24), соответственно.

[0076] В одном варианте реализации CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL содержат последовательности NYWMT (SEQ ID NO:19), SITNTGSSTFYPPDSVKG (SEQ ID NO:20), DTIAPFDY (SEQ ID NO:21), KASQNLNEYLN (SEQ ID NO:22), KTNTLQA (SEQ ID NO:23) и SQYQSGNT (SEQ ID NO:93), соответственно. В одном варианте реализации CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL содержат последовательности NYWMT (SEQ ID NO:19), SITNTGSSTFYPPDAVKG (SEQ ID NO:91), DTIAPFDY (SEQ ID NO:21), KASQNLNEYLN (SEQ ID NO:22), KTNTLQA (SEQ ID NO:23) и SQYQSGNT (SEQ ID NO:93), соответственно. В одном варианте реализации CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL содержат последовательности NYWMT (SEQ ID NO:19), SITNTGSSTFYPPESVKG (SEQ ID NO:92), DTIAPFDY (SEQ ID NO:21), KASQNLNEYLN (SEQ ID NO:22), KTNTLQA (SEQ ID NO:23) и SQYQSGNT (SEQ ID NO:93), соответственно.

[0077] Примеры таких последовательностей VH представлены в SEQ ID NO:44 (мышь) и 45-49 (гуманизированные) и 57-58 (гуманизированные). Примеры таких последовательностей VL представлены в SEQ ID NO:50 (мышь) и 51-55 (гуманизированные) и 56 (гуманизированные).

[0078] Примеры гуманизированных антител включают антитела, имеющие VH с последовательностью SEQ ID NO:49 и VL с последовательностью SEQ ID NO:52 или 54, или имеющие VH с последовательностью SEQ ID NO:48 и VL с последовательностью SEQ ID NO:53 или 54. Согласно одному варианту реализации гуманизированное антитело содержит VH с последовательностью SEQ ID NO:48 и VL с последовательностью SEQ ID NO:53. Согласно одному варианту реализации гуманизированное антитело содержит VH с последовательностью SEQ ID NO:48 и VL с последовательностью SEQ ID NO:56. Согласно одному варианту реализации гуманизированное антитело содержит VH с последовательностью SEQ ID NO:57 и VL

с последовательностью SEQ ID NO:56. Согласно одному варианту реализации гуманизованное антитело содержит VH с последовательностью SEQ ID NO:58 и VL с последовательностью SEQ ID NO:56.

[0079] В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент дополнительно содержат константную область тяжелой цепи (например, CH1, CH2 и/или CH3) и/или константную область легкой цепи (например, CL). Пример константной области тяжелой цепи представлен в SEQ ID NO:59, и пример константной области легкой цепи представлен в SEQ ID NO:67 (остатки 108-214).

[0080] Предусмотрено, что небольшие изменения (например, добавление, делеция или замена одной аминокислоты) могут быть сконструированы среди этих последовательностей CDR, которые могут сохранять активность антител или даже улучшать их. Такие модифицированные последовательности CDR называют вариантами CDR. Специалисту в данной области техники также будет ясно, что антитела, раскрытые в настоящей заявке, могут быть модифицированы таким образом, что их аминокислотная последовательность будет отличаться от встречающегося в природе связывающего полипептида, из которого они происходят. Например, полипептидная или аминокислотная последовательность, происходящая из обозначенного белка, может быть схожей, например, иметь определенный процент идентичности исходной последовательности, например, она может быть на 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична исходной последовательности. В некоторых вариантах реализации модифицированное антитело или фрагмент сохраняют обозначенные последовательности CDR.

[0081] В отдельных вариантах реализации антитело содержит аминокислотную последовательность или один или более фрагментов, которые обычно не связаны с антителом. Примеры модификаций более подробно описаны ниже. Например, антитело согласно изобретению может содержать гибкую линкерную последовательность или может быть модифицировано с добавлением функционального фрагмента (например, ПЭГ (полиэтиленгликоля), лекарственного средства, токсина или метки).

Полинуклеотиды, кодирующие белки, и способы получения белков

[0082] В соответствии с настоящим изобретением также предложены выделенные полинуклеотиды или молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие многофункциональные белки, антитела, их варианты или производные в соответствии с настоящим изобретением. Полинуклеотиды в соответствии с настоящим изобретением могут кодировать полноразмерные переменные области тяжелой и легкой цепей антиген-связывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотида. Кроме того, полинуклеотиды в соответствии с настоящим изобретением могут кодировать части переменных областей тяжелой и легкой цепей антиген-связывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотида.

[0083] Способы получения антител хорошо известны в данной области техники и описаны в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации обе переменные и константные области антиген-связывающих полипептидов в соответствии с настоящим изобретением являются полностью человеческими. Полностью человеческие антитела можно получить, применяя методики, описанные в данной области техники и описанные в настоящей заявке. Например, полностью человеческие антитела против конкретного антигена можно получить путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для продукции таких антител в ответ на провокацию антигеном, но эндогенные локусы которого были деактивированы. Примеры методик, которые могут быть использованы для получения таких антител, описаны в патентах США №№ 6,150,584, 6,458,592, 6,420,140, полностью включенных посредством ссылки.

Лечение рака

[0084] Как описано в настоящей заявке, антитела, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут быть использованы в определенных способах лечения и диагностики.

[0085] Настоящее изобретение дополнительно относится к многофункциональной молекуле или способам терапии на основе антител, включающим введение

многофункциональных молекул или антител согласно изобретению пациенту, такому как животное, млекопитающее и человек, для лечения одного или более расстройств или состояний, описанных в настоящей заявке. Терапевтические соединения согласно изобретению включают, не ограничиваясь перечисленным, антитела согласно изобретению (включая их варианты и производные, как описано в настоящей заявке) и нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды, кодирующие антитела согласно изобретению (включая их варианты и производные, как описано в настоящей заявке).

[0086] Антитела согласно изобретению также могут применяться для лечения или ингибирования рака. PD-L1 может быть сверхэкспрессирован в опухолевых клетках. Опухолевый PD-L1 может связываться с PD-1 на иммунных клетках, тем самым ограничивая противоопухолевый T-клеточный иммунитет. Результаты с использованием низкомолекулярных ингибиторов или моноклональных антител, нацеленных на PD-L1 в моделях опухолей мышей, показывают, что таргетная терапия PD-L1 является важной альтернативой и реалистичным подходом к эффективному контролю роста опухоли. Как продемонстрировано в экспериментальных примерах, антитела против PD-L1 активировали механизм адаптивного иммунного ответа, что может привести к улучшению выживаемости у больных раком.

[0087] Соответственно, в некоторых вариантах реализации предложены способы лечения рака у нуждающегося в этом пациента. Способ в одном из вариантов реализации включает введение указанному пациенту эффективного количества многофункциональной молекулы или антитела согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одна из раковых клеток (например, стромальные клетки) у пациента экспрессирует, сверхэкспрессирует или индуцирована для экспрессии PD-L1. Индукцию экспрессии PD-L1, например, можно осуществить путем введения вакцины против опухоли или радиотерапии.

[0088] Опухоли, которые экспрессируют белок PD-L1, включают опухоли рака мочевого пузыря, немелкоклеточного рака легкого, рака почки, рака молочной железы, рака уретры, колоректального рака, рака головы и шеи, плоскоклеточного рака, карциномы из клеток Меркеля, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака пищевода, рака яичника, рака почки и мелкоклеточного рака легкого. Соответственно, раскрытые в соответствии с настоящим изобретением антитела можно применять для лечения любого одного или более из таких типов рака.

[0089] Способы клеточной терапии, такие как терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR), также охватываются настоящим изобретением. Можно использовать подходящую клетку, которую приводят в контакт с антителом против PD-L1 согласно настоящему изобретению (или, в качестве альтернативы, генетически модифицированную для экспрессии антитела против PD-L1 согласно настоящему изобретению). После такого контакта или генетической модификации клетка затем может быть введена больному раком, нуждающемуся в лечении. У имеющего рак пациента может быть рак любого из типов, раскрытых в данной заявке. Клетка (например, Т-клетка) может представлять собой, например, инфильтрирующий опухоль Т-лимфоцит, CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку или их комбинацию, без ограничения.

[0090] В некоторых вариантах реализации клетка была выделена из самого имеющего рак пациента. В некоторых вариантах реализации клетка была предоставлена донором или получена из банка клеток. Когда клетку выделяют из имеющего рак пациента, можно минимизировать нежелательные иммунные реакции.

[0091] Дополнительные заболевания или состояния, связанные с повышенной выживаемостью клеток, которые можно лечить, предотвращать, диагностировать и/или прогнозировать с помощью антител или их вариантов или производных в соответствии с настоящим изобретением, включают, но не ограничены перечисленными: прогрессирование и/или метастазы злокачественных новообразований и связанных с ними расстройств, таких как лейкоз (включая острые лейкозы (например, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз (включая миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз)) и хронические лейкозы (например, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз)), истинную полицитемию, лимфомы (например, болезнь Ходжкина и неходжкинскую болезнь), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрёма, болезнь тяжелых цепей и солидные опухоли, включая, но не ограничиваясь саркомами и карциномами, такими как фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, карцинома толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак

щитовидной железы, рак эндометрия, меланома, рак предстательной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточная карцинома, базальноклеточная карцинома, аденокарцинома, карцинома потовых желез, карцинома сальных желез, папиллярная карцинома, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечно-клеточная карцинома, гепатома, карцинома желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, карцинома легкого, мелкоклеточная карцинома легкого, карцинома мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиома, менингиома, меланома, нейробластома и ретинобластома.

Композиции

[0092] Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям. Такие композиции содержат эффективное количество антитела и приемлемый носитель. В некоторых вариантах реализации композиция дополнительно включает второй противораковый агент (например, ингибитор иммунных контрольных точек).

[0093] В отдельном варианте реализации термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный федеральным или региональным надзорным органом или указанный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее как подходящий для применения у животных и, более конкретно, у человека. Кроме того, «фармацевтически приемлемый носитель» обычно представляет собой нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательную композицию любого типа.

[0094] Термин «носитель» относится к разбавителю, адьюванту, вспомогательному веществу или наполнителю, с которым вводится терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая таковые нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобные масла. Вода представляет собой предпочтительный носитель, когда фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также

можно применять в качестве жидких носителей, особенно для инъектируемых растворов. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицеринмоностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое сепарированное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и тому подобные вещества. Композиция, при желании, также может содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов, или рН-буферных веществ, таких как ацетаты, цитраты или фосфаты. Также предусмотрены антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Такие композиции могут находиться в виде растворов, суспензий, эмульсии, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и в тому подобных формах. Композицию можно составить в виде суппозитория, с обычными связующими веществами и носителями, такими как триглицериды. Состав для перорального применения может содержать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния фармацевтической степени чистоты и т.д. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin, содержание которого включено в настоящую заявку посредством ссылки. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество антиген-связывающего полипептида, предпочтительно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, чтобы предоставить форму для надлежащего введения пациенту. Состав должен подходить для способа введения. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика.

[0095] В одном варианте реализации рецептура композиции разработана в соответствии с рутинными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения людям. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буферном растворе. Когда это необходимо, композиция также может содержать солюбилизующий агент и местное анестезирующее средство, такое как лигнокаин, чтобы облегчить боль в месте инъекции. Обычно ингредиенты

поставляются либо по отдельности, либо в виде смеси в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. Когда композицию нужно вводить путем инфузии, ее можно поместить в инфузионный флакон, содержащий стерильную воду или солевой раствор фармацевтической степени чистоты. Когда композицию вводят путем инъекции, может быть предоставлена ампула стерильной воды для инъекции или солевого раствора, с которыми можно смешать ингредиенты перед введением.

ПРИМЕРЫ

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

[0096] В данном примере описано получение моноклональных антител мыши против PD-L1 человека, применяя гибридомную технологию.

[0097] *Антиген:* белок PDL1-Fc человека и PD-L1 человека высоко экспрессируются в клеточной линии CHO-K1 (клеточная линия PDL1- CHO-K1).

[0098] *Иммунизация:* Для получения моноклональных антител мыши, нацеленных на PD-L1 человека, мышей Balb/c и крыс Wistar сначала иммунизировали белком PD-L1-Fc. Иммунизированных мышей и крыс затем проводили стимулирующую иммунизацию белком PD-L1-Fc и стабильными клетками CHO-K1/PD-L1, соответственно. Для отбора мышей или крыс, продуцирующих антитела, которые связываются с белком PD-L1, проводили оценку титра антител в сыворотке иммунизированных мышей или крыс с помощью ELISA. Вкратце, микротитрационные планшеты покрывали белком PD-L1 человека при концентрации 0,5 мкг/мл в покрывающем буфере для ELISA, 100 мкл/лунку при температуре 4°C в течение ночи, затем блокировали с помощью 150 мкл/лунку 1% BSA. Разведения сыворотки из иммунизированных мышей добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1 - 2 часов при 37°C. Планшеты промывали ФБР/Tween, а затем инкубировали с антителом против IgG мыши, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), или с антителом против IgG крысы, конъюгированным с HRP, в течение 1 часа при 37°C. После промывки планшеты проявляли с помощью субстрата TMB и анализировали с помощью спектрофотометра при ОП 450 нм. После 3 раундов иммунизации проводили

также тестирование иммунных ответов с помощью ELISA сыворотки против белка rhPD-L1 и FACS против стабильной клеточной линии CHO-K1/PDL-1 с родительской клеточной линией CHO-K1 в качестве отрицательного контроля. Мышам с достаточными титрами IgG против PDL1 проводили стимулирующую иммунизацию с помощью 25 мкг белка PDL1-Fc человека после 3 циклов иммунизации. Полученных мышей использовали для слияния. Гибридомные супернатанты тестировали на IgG к PD-L1 с помощью ELISA.

[0099] *Слияние клеток*: Слияние проводили с помощью электрослияния. Слитые клетки высевали в 50 96-луночных планшетов для каждого слияния.

[0100] *Скрининг*: Супернатанты подвергали скринингу с помощью ELISA против рекомбинантного белка PD-L1-Fc человека (rh) и антигена для встречного скрининга. Затем положительные супернатанты подвергали подтверждающему скринингу из первичного скрининга с блокированием рецептора FACS против стабильной клеточной линии CHO-K1/PD-L1 и белка rhPD-1-Fc.

[0101] *Субклонирование и скрининг*: положительные первичные клоны из каждого слияния субклонировали путем предельного разведения для обеспечения того, чтобы субклоны были получены из одной родительской клетки. Скрининг субклонирования проводили таким же образом, как и скрининг первичных клонов, а супернатант культуры положительных клонов подвергали дополнительному подтверждающему скринингу путем ранжирования аффинности.

[0102] Для дальнейшего анализа были выбраны клоны гибридомы 47C6A3, 67F3G7 и 89C10H8. Аминокислотные последовательности переменных областей 47C6A3, 67F3G7 и 89C10H8 перечислены в **Таблице 1** ниже.

Таблица 1. Последовательности переменных областей 47C6A3, 67F3G7 и 89C10H8

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
47C6A3 VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYIIYSGSTS YNPSLKSRSISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARSTMIATNWFAYWGQGLVTV SA	1
47C6A3 VL	DIVMTQSHKFMSTSVVDRVSITCKASQDVSLAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVP DRFTGSGSGTDFALTISSVQAEDLALYYCQOHYITPWTFGGGTKLEIK	2

67F3G7 VH	QVKLLQSGAALVKPGASVKMSCKASGYIFDFWVSWVKQSHEKSLEWIGEIYPNSGVSR YNEKFKGRATMTVDKSTSTAYLELSRLTSEDSAIYYCTKYFGYTYWFGYWGQGTLVTVS S	3
67F3G7 VL	DTVLTQSPALAVSLGQRITISCRASKSVSTYMHYQQRSGLQPKLLIYSASHLESGVPS RFSGSGSGTDFTLTIDPVEADDIANYYCQQSNELPVTFGSGTKLEIK	4
89C10H8 VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLTLCVASGFTFSNYWMTWIRQAPGKLEWVASITNTGSSTF YPDSVKGRFTISRDNTRSTLFLQINSLRSEDATATYYCTRDTTIAPFDYWGQGMVTVSS	5
89C10H8 VL	DIQMTQSPSFLSASVGDRTVITCKASQNLNEYLNWYQQKLGAPKRLIYKTNTLQAGIP SRFSGSGSGIDYTLTISSLQPEDVATYFCQYNSGNTFGAGTKLELK	6

Таблица 1A. Последовательности CDR 47C6A3

47C6A3	Последовательность	SEQ ID NO:
CDRH1	SDYAWN	7
CDRH2	YIIYSGSTSYNPSLKS	8
CDRH3	STMIATNWFAY	9
CDRL1	KASQDVSLAVA	10
CDRL2	WASTRHT	11
CDRL3	QQHYITPWT	12

Таблица 1B. Последовательности CDR 67F3G7

67F3G7	Последовательность	SEQ ID NO:
CDRH1	DFWVS	13
CDRH2	EIYPNSGVSRYNEKFKG	14
CDRH3	YFGYTYWFGY	15
CDRL1	RASKSVSTYMH	16
CDRL2	SASHLES	17
CDRL3	QQSNELPVT	18

Таблица 1C. Последовательности CDR 89C10H8

89C10H8	Последовательность	SEQ ID NO:
CDRH1	NYWMT	19
CDRH2 ver DA ver ES	SITNTGSSTFYPPDSVKG SITNTGSSTFYPPDAVKG SITNTGSSTFYPPESVKG	20 91 92
CDRH3	DTTIAPFDY	21
CDRL1	KASQNLNEYLN	22
CDRL2	KTNTLQA	23
CDRL3 ver Q	SQYNSGNT SQYQSGNT	24 93

Пример 2: Активность связывания с антигеном PD-L1

Тестирование ELISA

[0103] Для оценки связывающей активности клонов гибридомы 47C6A3, 67F3G7 и 89C10H8 химерные mAb из этих клонов подвергали анализу ELISA.

[0104] Вкратце, микротитрационные планшеты покрывали белком PD-L1-Fc человека при концентрации 0,5 мкг/мл в PBS, 100 мкл/лунку при температуре 4 °C в течение ночи, затем блокировали с помощью 150 мкл/лунку 1% BSA. В каждую лунку добавляли трехкратные разведения антител 47C6A3, 67F3G7 и 89C10H8, начиная с 10 мкг/мл, и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Планшеты промывали ФБР/Tween, а затем инкубировали с антителом Fab мыши против человека, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 30 минут при 37°C. После промывки планшеты проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали с помощью спектрофотометра при ОП 450 нм. Как показано на **Фиг. 1**, 47C6A3, 67F3G7 и 89C10H8 связываются с PD-L1 человека с высокой аффинностью ($EC_{50}=10,24$ нг/мл для 47C6A3, $EC_{50}=10,76$ нг/мл для 67F3G7, $EC_{50}=8,112$ нг/мл для 89C10H8).

[0105] Клеточное связывание: FACS использовали для оценки связывающей активности химерных mAb 47C6A3, 67F3G7 и 89C10H8 на клетках CHOК1, сверхэкспрессирующих PD-L1 человека.

[0106] Вкратце, клетки PDL1-CHOК1 сначала инкубировали с 3-кратными последовательно разведенными химерными mAb 47C6A3, 67F3G7 и 89C10H8, начиная с 100 нМ при 4°C в течение 40 минут. После промывки PBS в каждую лунку добавляли Alexa Fluor® 647 AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L) и инкубировали при 4°C в течение 30 минут. Образцы дважды промывали в буфере для FACS. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) Alexa Fluor® 647 оценивали с помощью FACSCanto. Как показано на **ФИГ. 2**, 47C6A3, 67F3G7 и 89C10H8 связаны с клетками PDL1-CHOК1 с высокой аффинностью ($EC_{50}=0,1476$ нМ для 47C6A3, $EC_{50}=0,1035$ нМ для 67F3G7, $EC_{50}=0,1696$ нМ для 89C10H8).

Межвидовая активность

[0107] Анализ ELISA проводили для оценки связывания химерных антител с PD-L1 человека, мыши, крысы и яванского макака, соответственно.

[0108] Вкратце, микротитрационные планшеты покрывали белками PD-L1 человека, мыши, крысы и яванского макака при концентрации 0,5 мкг/мл в PBS, 100 мкл/лунку при температуре 4 °С в течение ночи, затем блокировали с помощью 150 мкл/лунку 1% BSA. В каждую лунку добавляли трехкратные разведения химерных антител, начиная с 10 мкг/мл, и инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. Планшеты промывали ФБР/Tween, а затем инкубировали с антителом Fab мыши против человека, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 30 минут при 37 °С. После промывки планшеты проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали с помощью спектрофотометра при ОП 450 нм. Антитела 47С6А3, 67F3G7 и 89С10Н8 связывались с PD-L1 человека и яванского макака, но не связывались с PD-L1 крысы и мыши (ФИГ.3 и Таблица 2).

Таблица 2. Межвидовая активность 47С6А3, 67F3G7 и 89С10Н8

	Человек	Яванский макак	Крыса	Мышь
EC50 47С6А3	10,24 нг/мл	6,336 нг/мл	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
EC50 67F3G7	10,76 нг/мл	6,797 нг/мл	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
EC50 89С10Н8	8,112 нг/мл	6,774 нг/мл	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания

Пример 3. Блокада связывания PD-L1 с PD-1 с помощью антител

[0109] Для того чтобы оценить блокирующее действие химерных mAb 47С6А3, 67F3G7 и 89С10Н8 на рекомбинантное связывание PD-L1 человека с его рецептором PD-1, использовали анализ блокирования рецепторов на основе ELISA.

[0110] Вкратце, микротитрационные планшеты покрывали белком PD-L1-Fc человека при концентрации 0,5 мкг/мл в ФБР, 100 мкл/лунку при температуре 4 °С в течение ночи, затем блокировали с помощью 150 мкл/лунку 1% BSA. 50 мкл белка PD-1-Fc человека, меченного биотином, и 3-кратные разведения антител 47С6А3, 67F3G7 и 89С10Н8, начиная с 10 мкг/мл при 50 мкл, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. Планшеты промывали ФБР/Tween, а затем инкубировали со стрептавидином-HRP в течение 10 минут при 37 °С. После промывки планшеты проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали с помощью спектрофотометра при ОП 450 нм. Как показано на ФИГ. 4, 47С6А3, 67F3G7 и 89С10Н8 эффективно

ингибировали связывание PD-L1 человека с PD1 человека при IC₅₀, обнаруженном при 91,18 нг/мл, 139,8 нг/мл, 129,8 нг/мл, соответственно.

Пример 4: Аффинность связывания mAb

[0111] Связывание антител 47C6A3, 67F3G7 и 89C10H8 с рекомбинантным белком PD-L1 (PD-L1 человека-his метка) исследовали с помощью Biacore, применяя способ захвата. mAb 47C6A3, 67F3G7 и 89C10H8 захватывали, применяя чип с белком А. Серийное разведение белка PD-L1 человека-his метка впрыскивали поверх захваченного антитела на 2 мин при скорости потока 30 мкл/мин. Антигену позволяли диссоциировать в течение 480-1500 с. Все эксперименты проводили на Biacore T200. Анализ результатов проводили, применяя программное обеспечение Biacore T200 Evaluation. Результаты показаны на **ФИГ.5** и в **Таблице 3** ниже.

Таблица 3. Аффинность, измеренная с помощью Biacore

Abs	PDL1-His		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
47C6A3	1,851E +6	6,785E-4	3,665E-10
67F3G7	2,538E+6	6.193E-5	2,441E-11
89C10H8	1,597E+6	6,636E-5	4.154E-11

Пример 5. Гуманизация мышиных антител

[0112] Гены вариабельных областей 47C6A3, 67F3G7 и 89C10H8 использовали для получения гуманизованных mAb. На первом этапе этого процесса аминокислотные последовательности VH и VL или VK 47C6A3, 67F3G7 и 89C10H8 сравнивали с доступной базой данных последовательностей генов Ig человека, чтобы найти наиболее совпадающие последовательности генов зародышевой линии Ig человека. Для легкой цепи 47C6A3 Vk1-4 человека является наиболее подходящей зародышевой линией, и для тяжелой цепи VH1-2 человека был выбран в качестве остова. Для легкой цепи 67F3G7 наиболее близкое совпадение с человеческим представляет собой ген Vk1-39/JK4, и для тяжелой цепи наиболее близкое совпадение с человеческим представляет собой ген VH1-2/JH4-FW4 человека. Для легкой цепи 89C10H8 наиболее близкое совпадение с человеческим представляет собой ген Vk1-17/JK2, и для тяжелой цепи наиболее близкое совпадение с человеческим представляет собой ген VH3-21/JH3 человека.

[0113] Для VL 47C6A3 - Vk1-4 человека является наиболее подходящей зародышевой линией, а для VH 47C6A3 - VH1-2 человека был выбран в качестве остова. Затем разработали гуманизированные последовательности 47C6A3 переменных доменов, в которых CDRL1, L2 и L3 были привиты на каркасные последовательности гена Vk1-4, а CDRH1, H2, и H3 - на каркасные последовательности гена VH1-2. Затем создали 3D-модель, чтобы определить, были ли какие-либо положения в каркасе, в которых замена аминокислот мыши на аминокислоты человека может повлиять на связывание и/или конформацию CDR. В случае тяжелой цепи, R, M и I в каркасе были вовлечены в обратные мутации.

[0114] Затем разработали гуманизированные последовательности переменных доменов 67F3G7, в которых CDRL1, L2 и L3 были привиты на каркасные последовательности гена Vk1-39/JK4, а CDRH1, H2, и H3 - на каркасные последовательности гена VH1-2/JH4-FW4. Затем создали 3D-модель, чтобы определить, были ли какие-либо положения в каркасе, в которых замена аминокислот мыши на аминокислоты человека может повлиять на связывание и/или конформацию CDR. В случае тяжелой цепи, V, K, T и I в каркасе были вовлечены в обратные мутации. В случае легкой цепи, T, V, L и Q в каркасе были вовлечены в обратные мутации.

[0115] Затем разработали гуманизированные последовательности переменных доменов 89C10H8, в которых CDRL1, L2 и L3 были привиты на каркасные последовательности гена Vk1-17/JK2, а CDRH1, H2, и H3 - на каркасные последовательности гена VH3-21/JH3. Затем создали 3D-модель, чтобы определить, были ли какие-либо положения в каркасе, в которых замена аминокислот мыши на аминокислоты человека может повлиять на связывание и/или конформацию CDR. В случае тяжелой цепи, A, T, I и S в каркасе были вовлечены в обратные мутации. В случае легкой цепи, Y, I, E и F в каркасе были вовлечены в обратные мутации.

[0116] Аминокислотные и нуклеотидные последовательности некоторых гуманизированных антител перечислены ниже в Таблице 4.

Таблица 4. Последовательности гуманизированных антител (подчеркивание обозначает CDR; жирным/курсивным шрифтом указаны обратные мутации)

47C6A3	Последовательность	SEQ ID NO:
--------	--------------------	------------

VH мыши	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYIIYSGST SYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARSTMIATNWFAYWGQGLTV TVSA	25
VH-V0	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYIIYSGST SYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCARSTMIATNWFAYWGQGLTV TVSS	26
VH-V1	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYIIYSGST SYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCARSTMIATNWFAYWGQGLTV TVSS	27
VH-V2	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWMGYIIYSGST SYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCARSTMIATNWFAYWGQGLTV TVSS	28
VL мыши	DIVMTQSHKFMSTSVDRVSITCKASQDVSLAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGV PDRFTGSGSGTDFALTISSVQAEDLALYYCQOHYITPWTFGGGTKLEIK	29
VL V0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSLAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYITPWTFGGGTKVEIK	30

67F3G7	Последовательность	SEQ ID NO:
VH мыши	QVKLLQSGAALVKPGASVKMSCKASGYIFDFWVSWVKQSHEKSLEWIGEYIPNSGVS RYNEKFKGRATMTVDKSTSTAYLELSRLTSEDSAIYYCTKYFGYTYWFGYWGQGLTV VSS	31
VH V0	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTDFWVSWVRQAPGQGLEWMGEYIPNSGVS RYNEKFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARYFGYTYWFGYWGQGLTV VSS	32
VH V1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTDFWVSWVRQAPGQGLEWMGEYIPNSGVS RYNEKFKGRVTMTVDKSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARYFGYTYWFGYWGQGLTV VSS	33
VH V2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTDFWVSWVRQAPGQGLEWMGEYIPNSGVS RYNEKFKGRVTMTVDKSISTAYMELSRLSDDTAVYYCTKYFGYTYWFGYWGQGLTV VSS	34
VH V3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYIFDFWVSWVRQAPGQGLEWIGEYIPNSGVS RYNEKFKGRVTMTVDKSISTAYMELSRLSDDTAVYYCTKYFGYTYWFGYWGQGLTV VSS	35
VH V4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYIFDFWVSWVRQAPGQGLEWIGEYIPNSGVS RYNEKFKGRVTMTVDKSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARYFGYTYWFGYWGQGLTV VSS	36
VH V5	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYIFDFWVSWVRQAPGKGLEWIGEYIPNSGVS RYNEKFKGRVTMTVDKSISTAYMELSRLSDDTAVYYCTKYFGYTYWFGYWGQGLTV VSS	37
VL мыши	DTVLTQSPALAVSLGQRITISCRASKSVSTYMHWYQQRSGLQPKLLIYSASHLESGV PSRFSGSGSGTDFLTIDPVEADDIANYYCQOSNELPVTFGGGTKLEIK	38
VL V0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSTYMHWYQQKPGKAPKLLIYSASHLESGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOSNELPVTFGGGTKVEIK	39
VL V1	D TVL TQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSTYMHWYQQKPGKAPKLLIYSASHLESGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOSNELPVTFGGGTKVEIK	40
VL V2	D TVL TQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSTYMHWYQQKPGK Q PKLLIYSASHLESGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOSNELPVTFGGGTKVEIK	41
VL V3	D TVL TQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSTYMHWYQQKPGK Q PKLLIYSASHLESGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOSNELPVTFGGGTKVEIK	42

VL V4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSVSTYMHWYQQKPGKQPKLLIYSASHLESGV PSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQOSNELPVTFFGGGTKVEIK	43
-------	---	----

89C10H8	Последовательность	SEQ ID NO:
VH мыши	EVQLVESGGGLVQPGRSLTLCVASFSTSRNYWMTWIRQAPGKGLEWVASITNTGSST FYPDSVKGRFTISRDNTRSTLFLQINSLRSEDATYYCTRDTTIAPFDYWGQGMVTV SS	44
VH V0	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVSSITNTGSST FYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTTIAPFDYWGQGMVTV SS	45
VH V1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVASITNTGSST FYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTTIAPFDYWGQGMVTV SS	46
VH V2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVASITNTGSST FYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTTIAPFDYWGQGMVTV SS	47
VH V3	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVASITNTGSST FYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTTIAPFDYWGQGMVTV SS	48
VH V4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVASITNTGSST FYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTTIAPFDYWGQGMVTV SS	49
VL мыши	DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCKASQNLNEYLNWYQQKLGAPKRLIYKTNLQAGI PSRFSGSGSGIDYTLTISLQPEDVATYFCSQYNSGNTFGAGTKLEIK	50
VL V0	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNLNEYLNWYQQKPGKAPKRLIYKTNLQAGV PSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYNSGNTFGQGTKLEIK	51
VL V1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNLNEYLNWYQQKPGKAPKRLIYKTNLQAGV PSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQYNSGNTFGQGTKLEIK	52
VL V2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNLNEYLNWYQQKPGKAPKRLIYKTNLQAGI PSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQYNSGNTFGQGTKLEIK	53
VL V3	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNLNEYLNWYQQKPGKAPKRLIYKTNLQAGI PSRFSGSGSGIDYTLTISLQPEDFATYYCQYNSGNTFGQGTKLEIK	54
VL V4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNLNEYLNWYQQKLGAPKRLIYKTNLQAGI PSRFSGSGSGIDYTLTISLQPEDFATYFCQYNSGNTFGQGTKLEIK	55

[0117] Ген был клонирован в вектор pCDNA 3.4 и трансфицирован в клетки 293F. Антитела были получены в соответствии со следующей таблицей.

[0118] Гены гуманизированных VH и VL продуцировали синтетически, а затем, соответственно, клонировали в векторы, содержащие константные домены гамма-1 и каппа человека. При спаривании VH человека и VL человека создавали 41 гуманизированное антитело (см. Таблицу 5).

Таблица 5. Гуманизированные антитела с их областями VH и VL

A. 47C6A3

VH	VL	47C6A3 VL	47C6A3 VL-V0
47C6A3 VH		47C6A3-химера	
47C6A3 VH.V0			Hu47C6A3-1
47C6A3 VH.V1			Hu47C6A3-2
47C6A3 VH.V2			Hu47C6A3-3

B. 67F3G7

VH	VL	67F3G7 VL.V0	67F3G7 VL.V1	67F3G7 VL.V2	67F3G7 VL.V3	67F3G7 VL.V4	67F3G7 VL
67F3G7 VH.V1		Hu 67F3G7-1	Hu 67F3G7-6	Hu 67F3G7-11	Hu 67F3G7-16	Hu 67F3G7-21	
67F3G7 VH.V2		Hu 67F3G7-2	Hu 67F3G7-7	Hu 67F3G7-12	Hu 67F3G7-17	Hu 67F3G7-22	
67F3G7 VH.V3		Hu 67F3G7-3	Hu 67F3G7-8	Hu 67F3G7-13	Hu 67F3G7-18		
67F3G7 VH.V4		Hu 67F3G7-4	Hu 67F3G7-9	Hu 67F3G7-14	Hu 67F3G7-19		
67F3G7 VH.V5		Hu 67F3G7-5	Hu 67F3G7-10	Hu 67F3G7-15	Hu 67F3G7-20		
67F3G7 VH							67F3G7-химера

C. 89C10H8

VH	VL	89C10H8 VL.V1	89C10H8 VL.V2	89C10H8 VL.V3	89C10H8 VL.V4	89C10H8 VL
89C10H8 VH.V1		Hu 89C10H8-1	Hu 89C10H8-5	Hu 89C10H8-9	Hu 89C10H8-13	
89C10H8 VH.V2		Hu 89C10H8-2	Hu 89C10H8-6	Hu 89C10H8-10	Hu 89C10H8-14	
89C10H8 VH.V3		Hu 89C10H8-3	Hu 89C10H8-7	Hu 89C10H8-11	Hu 89C10H8-15	
89C10H8 VH.V4		Hu 89C10H8-4	Hu 89C10H8-8	Hu 89C10H8-12	Hu 89C10H8-16	
89C10H8 VH						89C10H8-химера

Пример 6: Антигенсвязывающие свойства гуманизированных антител

Связывание с рекомбинантным PD-L1 человека

[0119] Для оценки антигенсвязывающей активности гуманизированные антитела подвергали тесту ELISA. Вкратце, микротитрационные планшеты покрывали белком PD-L1-Fc человека при концентрации 0,5 мкг/мл в ФБР, 100 мкл/лунку при температуре 4 °С в течение ночи, затем блокировали с помощью 200 мкл/лунку 1% BSA. В каждую лунку добавляли трехкратные разведения гуманизированных антител, начиная с 10 мкг/мл, и инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. Планшеты промывали ФБР/Tween, а затем инкубировали с антителом Fab мыши против человека, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 1 часа при 37 °С. После промывки планшеты проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали с помощью спектрофотометра при ОП 450 нм. Как показано на ФИГ. 6, все гуманизированные антитела продемонстрировали сопоставимую эффективность связывания с PD-L1 человека в качестве химерного антитела.

[0120] Для того чтобы исследовать кинетику связывания гуманизированных антител, в данном примере проводили ранжирование по аффинности, применяя Biacore. Как показано в Таблице 6, Hu67F3G7-2, Hu67F3G7-3, Hu67F3G7-5, Hu67F3G7-7, Hu67F3G7-22, Hu89C10H8-4, Hu89C10H8-7, Hu89C10H8-11, и Hu89C10H8-12 показали высокую аффинность, которая сопоставима с таковой у химерных антител.

Таблица 6. Ранжирование по аффинности гуманизированных антител

Abs	PDL1-His		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
Hu67F3G7-1	1,855E+6	1,214E-4	6,548E-11
Hu67F3G7-2	2,569E+6	9,748E-5	3,795E-11
Hu67F3G7-3	2,803E+6	9,716E-5	3,466E-11
Hu67F3G7-4	1,883E+6	1,031E-4	5,477E-11
Hu67F3G7-5	2,621E+6	9,711E-5	3,704E-11
Hu67F3G7-6	2,006E+6	1,177E-4	5,867E-11
Hu67F3G7-7	2,687E+6	9,493E-5	3,533E-11
Hu67F3G7-8	2,765E+6	9,844E-5	3,560E-11
Hu67F3G7-9	2,214E+6	1,004E-4	4,535E-11
Hu67F3G7-10	2,383E+6	9,335E-5	3,918E-11
Hu67F3G7-11	5,114E+6	1,643E-4	3,213E-11
Hu67F3G7-12	2,565E+6	9,013E-5	3,513E-11
Hu67F3G7-13	2,798E+6	9,535E-5	3,408E-11
Hu67F3G7-14	2,092E+6	1,086E-4	5,191E-11
Hu67F3G7-15	2,610E+6	9,688E-5	3,712E-11
Hu67F3G7-16	1,478E+6	1,114E-4	7,537E-11
Hu67F3G7-17	2,741E+6	1,014E-4	3,698E-11
Hu67F3G7-18	2,876E+6	9,511E-5	3,307E-11
Hu67F3G7-19	1,970E+6	1,074E-4	5,451E-11
Hu67F3G7-20	2,698E+6	9,363E-5	3,471E-11
Hu67F3G7-21	5,399E+5	8,425E-5	1,560E-10
Hu67F3G7-22	1,669E+6	7,261E-5	4,351E-11

Abs	PDL1-His		
	ka (1/Mc)	kd (1/s)	KD (M)
Hu89C10H8-1	7,541E+5	4,654E-4	6,172E-10
Hu89C10H8-2	6,411E+5	8,506E-5	1,327E-10
Hu89C10H8-3	7,375E+5	5,793E-5	7,855E-11
Hu89C10H8-4	6,230E+5	5,944E-5	9,542E-11
Hu89C10H8-5	6,707E+5	4,939E-4	7,364E-10
Hu89C10H8-6	7,010E+5	8,560E-5	1,221E-10
Hu89C10H8-7	6,150E+5	6,613E-5	1,075E-10
Hu89C10H8-8	6,550E+5	6,663E-5	1,017E-10
Hu89C10H8-9	6,712E+5	4,784E-4	7,127E-10
Hu89C10H8-10	5,950E+5	8,988E-5	1,511E-10
Hu89C10H8-11	7,001E+5	6,732E-5	9,615E-11
Hu89C10H8-12	7,269E+5	7,036E-5	9,680E-11
Hu89C10H8-13	7,644E+5	4,327E-4	5,611E-10
Hu89C10H8-14	7,125E+5	9,752E-5	1,369E-10
Hu89C10H8-15	7,814E+5	7,170E-5	9,176E-11
Hu89C10H8-16	6,671E+5	6,537E-5	9,799E-11

Связывание с PD-L1 человека, сверхэкспрессированным на клетках млекопитающих

[0121] Для оценки антигенсвязывающего свойства гуманизированные антитела анализировали на их связывание с PD-L1, сверхэкспрессированным на клетках млекопитающих, с помощью FACS. Вкратце, клетки PDL1-CHOK1 сначала инкубировали с 3-кратными серийно разбавленными гуманизированными антителами, начиная с 15 мкг/мл при 4°C в течение 40 минут. После промывки PBS в каждую лунку добавляли козье антитело Alexa Fluor® 647 AffiniPure против человеческого IgG (H+L) и инкубировали при 4°C в течение 30 минут. MFI Alexa Fluor® 647 оценивали с помощью FACSCanto. Как показано на ФИГ. 7, все гуманизированные антитела могут высокоэффективно связываться с PD-L1, экспрессируемым на клетках млекопитающих.

Полная кинетическая аффинность гуманизированных антител, определенная с помощью Biacore

[0122] Связывание гуманизированных антител с рекомбинантным белком PD-L1 (PD-L1 человека-his метка) исследовали с помощью Biacore, применяя способ захвата. mAb Hu47C6A3-1, Hu47C6A3-2, Hu47C6A3-3, Hu67F3G7-2, Hu67F3G7-3, Hu67F3G7-5, Hu67F3G7-7, Hu67F3G7-22, Hu89C10H8-4, Hu89C10H8-7, Hu89C10H8-11 и Hu89C10H8-12 захватывали, применяя чип с белком А. Серийное разведение белка PD-L1 человека-his метка впрыскивали поверх захваченного антитела на 2 мин при скорости потока 30 мкл/мин. Антигену позволяли диссоциировать в течение 1500 с. Все эксперименты проводили на Biacore T200. Анализ результатов проводили, применяя программное обеспечение Biacore T200 Evaluation, и результаты показаны в Таблице 7 ниже.

Таблица 7 Аффинность, определенная с помощью Biacore

Abs	PDL1-His		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
HSP209-chi	1,851E+6	6,785E-4	3,665E-10
Hu47C6A3-1	1,235E+6	5,933E-4	4,805E-10
Hu47C6A3-2	2,451E+6	9,000E-4	3,672E-10
Hu47C6A3-3	2,176E+6	9,661E-4	4,440E-10

Abs	PDL1-His		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)

Hu67F3G7-2	1,915E+6	7,032E-5	3,672E-11
Hu67F3G7-3	2,088E+6	7,737E-5	3,706E-11
Hu67F3G7-5	1,838E+6	7,920E-5	4,310E-11
Hu67F3G7-7	2,211E+6	7,252E-5	3,280E-11
Hu67F3G7-22	1,779E+6	5,791E-5	3,256E-11

Abs	PDL1-His		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
Hu89C10H8-4	5,623E+5	5,408E-5	9,618E-11
Hu89C10H8-7	5,685E+5	5,313E-5	9,346E-11
Hu89C10H8-11	5,640E+5	5,542E-5	9,826E-11
Hu89C10H8-12	5,867E+5	5,587E-5	9,522E-11

Пример 7: Блокада связывания PDL1 с PD1 гуманизированными антителами

Анализ блокирования рецепторов с использованием рекомбинантного PD-L1 человека

[0123] Существует два рецептора, PD-1 и CD80, для PD-L1 человека. Для того чтобы исследовать блокирующее свойство гуманизированного антитела против PD-L1 к этим двум белкам, в настоящем изобретении использовали анализ блокирования рецептора на основе белка.

[0124] Вкратце, микротитрационные планшеты покрывали белком PD-L1-Fc человека при концентрации 0,5 мкг/мл в PBS, 100 мкл/лунку при температуре 4 °C в течение ночи, затем блокировали с помощью 150 мкл/лунку 1% BSA при 37 °C в течение 2 часов. 50 мкл белка PD-1-Fc человека или CD80-Fc, меченного биотином, и 3-кратные разведения антител PD-L1, начиная с 10 мкг/мл при 50 мкл, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1 часа при 37 °C. Планшеты промывали ФБР/Tween, а затем инкубировали со стрептавидином-HRP в течение 10 минут при 37 °C. После промывки планшеты проявляли с помощью субстрата TMB и анализировали с помощью спектрофотометра при ОП 450 нм. Как показано на **ФИГ. 8**, Hu47C6A3-1, Hu47C6A3-2, Hu47C6A3-3, Hu67F3G7-2, Hu67F3G7-3, Hu67F3G7-5, Hu67F3G7-7, Hu67F3G7-22, Hu89C10H8-4, Hu89C10H8-7, Hu89C10H8-11 и Hu89C10H8-12 эффективно ингибировали связывание PD-L1 человека с PD1 человека. Кроме того, Hu47C6A3-1, Hu47C6A3-2, Hu47C6A3-3, Hu67F3G7-2, Hu67F3G7-3, Hu67F3G7-5, Hu67F3G7-7, Hu67F3G7-22, Hu89C10H8-4, Hu89C10H8-7, Hu89C10H8-11 и Hu89C10H8-12 эффективно ингибировали связывание PD-L1 человека с CD80 человека зависимым от дозы образом (**ФИГ. 9**).

Пример 8. Бифункциональное нацеливание на белок как на пути PD-L1, так и на пути TGF-β

[0125] В данном примере получали и тестировали бифункциональное рекомбинантное антитело против PD-L1 и гибридные белки TGF-β RII.

[0126] Легкая цепь молекулы представляет собой легкую цепь mAb против PDL1. Тяжелая цепь представляет собой слияние тяжелой цепи mAb против PDL1 с помощью гибкого (Gly₄Ser)₄Gly линкера с N-концом растворимого внеклеточного домена TGF-β RII. На границе слияния C-концевой остаток лизина тяжелой цепи антитела мутировали в аланин для уменьшения потенциального протеолитического расщепления.

[0127] В некоторых примерах потенциальные сайты модификации в CDR были мутированы до аналогичных аминокислот. Последовательности части против PD-L1 показаны ниже в Таблице 8.

Таблица 8. Последовательности варибельных областей части антитела в бифункциональных молекулах

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
02 VH (67F3G7 VH V2)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFD <u>DFWVS</u> WVRQAPGQGLEWMGE <u>IYPNSGVSRYNEKFKGR</u> VTMTVDKSIStAYMELSRRLRSDDTAVYYCTK <u>YF</u> <u>GYTYWFGY</u> WGQGTLLTVSS	34
02 VL (67F3G7 VL V4)	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCR <u>ASKSVSTYMH</u> WYQQKPKGKPKLLIYS <u>ASHLE</u> SGVPSRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYC <u>QOSNELPVT</u> FGG GTKVEIK	43
06 VH (89C10H8 VH V3)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS <u>NYWMT</u> WIRQAPGKGLEWVAS <u>ITNTGSSTFYPDSVKGR</u> RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR <u>DT</u> <u>TIAPFDY</u> WGQGTMTVSS	48
06 VL (89C10H8 VL V2)	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC <u>KASONLNEYLN</u> WYQQKPKGKAPKRLIYK <u>TNTLQAG</u> IPSRFSGSGSDTYTLTISLQPEDFATYYC <u>SOYNSGNT</u> FGQ GTKLEIK	53
06a VH (89C10H8 VH V3)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS <u>NYWMT</u> WIRQAPGKGLEWVAS <u>ITNTGSSTFYPDSVKGR</u> RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR <u>DT</u> <u>TIAPFDY</u> WGQGTMTVSS	48
06a VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC <u>KASONLNEYLN</u> WYQQKPKGKAPKRLIYK <u>TNTLQAG</u> IPSRFSGSGSDTYTLTISLQPEDFATYYC <u>SOYQSGNT</u> FGQ GTKLEIK	56
06a-DA VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS <u>NYWMT</u> WIRQAPGKGLEWVAS <u>ITNTGSSTFYPD</u> <u>AVKGR</u> RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR <u>DT</u> <u>TIAPFDY</u> WGQGTMTVSS	57

06a-ES VH	EVQLVESGGGLV ^K PGGSLRLS ^{CAASGFTFS} <u>SNYWMT</u> WIRQAPGKGLEWVAS <u>ITNTGSSTFYPE</u> <u>ESV</u> KGRFTISRDNAKNSLYLQMN ^{SLRAEDTAVYYCTR} <u>DT</u> <u>TIAPFDY</u> WGQGM ^{TVSS}	58
89C10H8 CDRH2 DA	SITNTGSSTFY ^{PDA} VK ^G	91
89C10H8 CDRH2 ES	SITNTGSSTFY ^{ES} VK ^G	92
89C10H8 CDRL3 ver Q	SQYQ ^S SGNT	93

Таблица 9. VH/VL бифункциональных молекул

Бифункциональная молекула	VH	VL
LP008-02	02 VH	02 VL
LP008-06	06 VH	06 VL
LP008-06a	06a VH	06a VL
LP008-06a-DA	06a-DA VH	06a VL
LP008-06a-ES	06a-ES VH	06a VL

[0128] Помимо VH, тяжелая цепь бифункциональной молекулы дополнительно включает константные области (с C-концом K, мутированным в A), линкер (Gly₄Ser)₄Gly и N-конец растворимого внеклеточного домена TGF-β RII. Их последовательности приведены в Таблице 10.

Таблица 10. Дополнительные последовательности тяжелой цепи и целых тяжелых/легких цепей

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
Константные области тяжелой цепи	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT ^{SV} WNSGALTS ^{GV} HTFPAVLQSSGLYSLSSV ^{TV} PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK ^{VDR} VEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV ^V VDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD ^W LN ^{GK} EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL ^{TC} LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV ^{DKSR} W QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGA	59
(Gly ₄ Ser) ₄ Gly линкер	GGGGSGGGSGGGSGGGSG	60
Внеклеточный домен TGF-β RII	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC ^D VR ^F STCDNQKSCMS ^{NC} SI TSICEKQ ^{EV} CVAVWRKNDENITLET ^V CH ^{DP} KLPYHDFILEDAAS ^{PK} CIM KEKKKPGETFFM ^C SCSSDECNDNIIFSEEYNTSN ^{PD}	61
Тяжелая цепь LP008-02	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV ^S CKASGYTFTDFWV ^{SW} VRQAPGQGLEW ^{MGE} IYPNSGVSRYNEKFKGRVTMTVDK ^{SI} STAYMEL ^{SRL} RSDDTAVYYCT ^{KY} F GYTYWFGYWGQGLT ^{LVT} VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL ^{VKD} YFPEPVT ^{SV} WNSGALTS ^{GV} HTFPAVLQSSGLYSLSSV ^{TV} PSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTK ^{VDR} VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK ^{PK} DTLMISRTPEVTCV ^V VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ ^{YNS} TYRVVSVLTVLHQD ^W LN ^{GK} EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP ^{QV} YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT ^{PPV} L DSDGSFFLYSKLTV ^{DKSR} WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAG	62

	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGI PPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKF CDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHD PKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEY NTSNPD	
Тяжелая цепь LP008- 06	EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFSNYWMTWIRQAPGKGLEWVAS ITNTGSSTFY PDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDT TIAPFDYWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTP E VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQD WLNKKEYCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGAGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGI PPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC DVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDP KLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYN TSNPD	63
Тяжелая цепь LP008- 06a	EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFSNYWMTWIRQAPGKGLEWVAS ITNTGSSTFY PDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDT TIAPFDYWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTP E VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQD WLNKKEYCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGAGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGI PPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC DVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDP KLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYN TSNPD	64
Тяжелая цепь LP008- 06a-DA	EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFSNYWMTWIRQAPGKGLEWVAS ITNTGSSTFY PDAVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDT TIAPFDYWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTP E VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQD WLNKKEYCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGAGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGI PPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC DVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDP KLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYN TSNPD	65
Тяжелая цепь LP008- 06a-ES	EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFSNYWMTWIRQAPGKGLEWVAS ITNTGSSTFY P ESVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDT TIAPFDYWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTP E VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQD WLNKKEYCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGAGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGI PPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC DVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDP KLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYN TSNPD	66

Легкая цепь LP008-02	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSVSTYMHWYQQKPGKQP KLLIYS ASHLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNELPVTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAVQWVKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	67
Легкая цепь LP008-06	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNLNEYLNWYQQKPGKAPKRLIYK TNTLQAGIPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCSQYNSGNTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAVQWVKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	68
Легкая цепь LP008-06a (& DA/ES)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNLNEYLNWYQQKPGKAPKRLIYK TNTLQAGIPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCSQYQS-GNTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAVQWVKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	69

Пример 9: Аффинность связывания бифункциональных молекул

[0129] Связывания бифункциональных молекул LP008-06, LP008-06a, LP008-06a-DA и LP008-06a-ES с рекомбинантным белком PD-L1 (PD-L1 человека-his метка) тестировали с помощью *Biacore*, используя способ захвата.

[0130] Бифункциональные молекулы захватывали, применяя чип с белком А. Серийное разведение белка PD-L1 человека-his метка впрыскивали поверх захваченного антитела в течение 2 мин при скорости потока 30 мкл/мин. Антигену позволяли диссоциировать в течение 1500 с. Все эксперименты проводили на *Biacore* T200. Анализ результатов проводили, применяя программное обеспечение *Biacore* T200 Evaluation. Результаты показаны на **ФИГ.10** и в Таблице 11 ниже.

Таблица 11. Тестирование на аффинность с помощью *Biacore*

Abs	PD-L1 человека		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
LP008-06	7,832E+5	5,918E-5	7,556E-11
LP008-06a	6,865E+5	5,276E-5	7,684E-11
LP008-06a-DA	6,613E+5	4,795E-5	7,252E-11
LP008-06a-ES	8,404E+5	5,300E-5	6,307E-11

[0131] Связывание LP008-02 с рекомбинантным белком PD-L1 и TGF- β 1 человека исследовали с помощью *Biacore*, применяя способ захвата.

[0132] LP008-02 захватывали, применяя чип с белком А. Серийное разведение белка PD-L1 человека-his метка и TGF- β 1 человека впрыскивали поверх захваченного антитела в течение 2 мин при скорости потока 30 мкл/мин. PD-L1 позволяли

диссоциировать в течение 680 с, а TGF- β 1 позволяли диссоциировать в течение 1000 с. Все эксперименты проводили на Biacore T200. Анализ результатов проводили, применяя программное обеспечение Biacore T200 Evaluation. Результаты показаны на ФИГ.11 и в Таблице 12 ниже.

Таблица 12. Тестирование аффинности с помощью Biacore

	LP008-02		
	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)
PD-L1	2,528E+6	1,044E-4	4,130E-11
TGF-β1	1,294E+8	2,716E-4	2,099E-12

Пример 10: Функциональный анализ блокады PD-1/PD-L1

[0133] В данном примере активность бифункциональных молекул при блокировании взаимодействия PD1/PD-L1 измеряли с помощью билюминесцентного анализа на основе клеток.

[0134] В этом анализе, когда эффекторные клетки PD1 совместно культивируют с клетками-мишенями PD-L1, взаимодействие PD-1/PD-L1 ингибирует передачу сигналов TCR и NFAT-RE-опосредованную люминесценцию. Добавление либо антитела против PD-1, либо антитела против PD-L1, которое блокирует взаимодействие PD-1/PD-L1, которое высвобождает ингибирующий сигнал и приводит к активации TCR и NFAT-RE-опосредованной люминесценции.

[0135] Как показано на ФИГ. 12, LP008-02 и LP008-06a-ES блокировали взаимодействие PD1 и PD-L1 со значительно более высокой активностью, чем M7824 (M7824 EC₅₀= 0,8504 нМ, LP008-02 EC₅₀= 0,3630нМ, LP008-06a-ES EC₅₀= 0,4553нМ).

Пример 11: Функциональный анализ TGF- β

[0136] В этом примере использовали анализ люциферазы для оценки эффекта LP008-02 и LP008-06a-ES в отношении канонической передачи сигналов TGF- β .

[0137] Серийные разведения M7824 (бифункциональный слитый белок против PD-L1/TGF β Trap, см., например, Knudson et al., *Oncimmunology*. 2018; 7(5): e1426519), LP008-02 или LP008-06a-ES инкубировали с 293 клетками, трансфицированными репортером люциферазы SBE, в течение примерно 20 часов в присутствии рекомбинантного TGF- β человека.

[0138] Как показано на **ФИГ. 13**, M7824, LP008-02 и LP008-06a-ES блокировали каноническую передачу сигналов TGF- β ($IC_{50} = 0,06687$ нМ, $IC_{50}=0,07352$ нМ, $IC_{50}=0,07167$ нМ) в системе анализа репортера люциферазы TGF- β SBE, сконструированной из 293 клеток.

Пример 12: Связывание с PD-L1 человека

ELISA с рекомбинантным PD-L1 человека

[0139] Для оценки активности связывания M7824, LP008-02 и LP008-06a-ES бифункциональные молекулы подвергали тесту ELISA.

[0140] Вкратце, микротитрационные планшеты покрывали белком PD-L1-His человека при концентрации 0,5 мкг/мл в PBS, 100 мкл/лунку при температуре 4 °C в течение ночи, затем блокировали с помощью 150 мкл/лунку 1% BSA. В каждую лунку добавляли трехкратные разведения M7824, LP008-02 и LP008-06a-ES, начиная с 1 мкг/мл, и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Планшеты промывали ФБР/Tween, а затем инкубировали с антителом козы против IgG человека, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 30 минут при 37°C. После промывки планшеты проявляли с помощью субстрата TMB и анализировали с помощью спектрофотометра при ОП 450 нм.

[0141] Как показано на **ФИГ. 14**, LP008-02 и LP008-06a-ES связываются с PD-L1 человека со значительно более высокой активностью, чем M7824 ($EC_{50}=11,82$ нг/мл и $EC_{50}=14,36$ нг/мл по сравнению с $EC_{50}=23,68$ нг/мл).

Межвидовая активность

[0142] Для оценки связывания биспецифических антител с PD-L1 мыши, PD-L1 крысы, PD-L1 яванского макака тестировали антитела с помощью ELISA.

[0143] Вкратце, микротитрационные планшеты покрывали белками PD-L1 мыши, крысы и яванского макака при концентрации 0,5 мкг/мл в PBS, 100 мкл/лунку при температуре 4 °C в течение ночи, затем блокировали с помощью 150 мкл/лунку 1% BSA. В каждую лунку добавляли трехкратные разведения биспецифических антител, начиная с 1 мкг/мл, и инкубировали в течение 1 часа при 37 °C. Планшеты промывали ФБР/Tween, а затем инкубировали с антителом козы против IgG человека, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 30 минут при 37°C. После

промывки планшеты проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали с помощью спектрофотометра при ОП 450 нм.

[0144] LP008-02 и LP008-06a-ES были способны связываться с PD-L1 яванского макака с более высокой аффинностью, чем M7824, но только M7824 способен связываться с PD-L1 крысы и мыши (ФИГ. 15 и таблица 13).

Таблица 13. Межвидовая активность M7824, CZ010-02 и CZ010-06a-ES

EC50	Яванский макак	Крыса	Мышь
M7824	25,60 нг/мл	14,25 нг/мл	10,60 нг/мл
LP008-02	7,890 нг/мл	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
LP008-06a-ES	10,92 нг/мл	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания

Пример 13: Активность связывания с TGF-β человека

ИФА с применением рекомбинантного TGF-β человека

[0145] Для оценки активности связывания M7824, LP008-02 и LP008-06a-ES с TGF-β человека эти бифункциональные молекулы подвергали тесту ELISA.

[0146] Вкратце, микротитрационные планшеты покрывали белком TGF-β человека при концентрации 1 мкг/мл в PBS, 100 мкл/лунку при температуре 4 °С в течение ночи, затем блокировали с помощью 150 мкл/лунку 1% BSA. В каждую лунку добавляли трехкратные разведения бифункциональных молекул M7824, LP008-02 и LP008-06a-ES, начиная с 10 мкг/мл, и инкубировали в течение 1 часа при 37°С. Планшеты промывали ФБР/Tween, а затем инкубировали с антителом козы против IgG человека, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 30 минут при 37°С. После промывки планшеты проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали с помощью спектрофотометра при ОП 450 нм.

[0147] Как показано на ФИГ. 16, все M7824, LP008-02 и LP008-06a-ES связывались с TGF-β человека с высокой активностью (EC₅₀=43,43 нг/мл, EC₅₀=28,58 нг/мл, EC₅₀=39,38 нг/мл).

Межвидовая активность

[0148] Для оценки связывания биспецифических антител с TGF-β мыши, крысы и яванского макака бифункциональные молекулы подвергали тесту ELISA.

[0149] Вкратце, микротитрационные планшеты покрывали белком TGF- β мыши, крысы и яванского макака при концентрации 1 мкг/мл в PBS, 100 мкл/лунку при температуре 4 °С в течение ночи, затем блокировали с помощью 150 мкл/лунку 1% BSA. В каждую лунку добавляли трехкратные разведения биспецифических антител, начиная с 10 мкг/мл, и инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. Планшеты промывали ФБР/Tween, а затем инкубировали с антителом козы против IgG человека, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 30 минут при 37°С. После промывки планшеты проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали с помощью спектрофотометра при ОП 450 нм.

[0150] Все протестированные бифункциональные молекулы связываются с TGF- β яванского макака, крысы и мыши с высокой активностью (ФИГ. 17 и Таблица 14).

Таблица 14. Межвидовая активность M7824, LP008-02 и LP008-06a-ES

EC50	Яванский макак	Крыса	Мышь
M7824	39,66 нг/мл	123,9 нг/мл	46,17 нг/мл
LP008-02	34,41 нг/мл	77,84 нг/мл	34,70 нг/мл
LP008-06a-ES	58,35 нг/мл	120,7 нг/мл	58,26 нг/мл

Пример 14: Эффективность на мышинной модели опухоли MC38

[0151] В этом примере использовали модель опухоли мыши для проверки эффективности бифункциональных молекул *in vivo*.

[0152] Клетки MC38, экспрессирующие PD-L1 человека, ресуспендированные в PBS, высевали подкожно в кожу справа у гуманизированных B-hPD-L1 мышей при концентрации 5×10^5 клеток в объеме 0,2 мл. Когда средний объем опухоли достигал приблизительно 55 мм³, для группы отбирали 24 мыши с соответствующим индивидуальным объемом опухоли, и животных случайным образом распределяли на 4 экспериментальные группы в соответствии с объемом опухоли, по 6 животных в каждой группе. После инъекции mAb против mCD20 общие IgG человека, M7824, LP008-02 и LP008-06a-ES вводили 3 раза в неделю путем интраперитонеальной инъекции. Дозу рассчитывали на основании массы тела экспериментального животного, исходя из 10 мкг/г. Массу мышей и размер опухолей тестировали два раза в неделю.

[0153] Результаты показаны на **ФИГ. 18**. Бифункциональные молекулы LP008-02 и LP008-06a-ES продемонстрировали лучшую эффективность, чем M7824, на этих животных моделях с точки зрения ингибирования роста опухоли. Кроме того, смерти животных наблюдались как в группах IgG, так и в группах M7824, но не в группах LP008-02 и LP008-06a-ES, демонстрируя лучшие профили безопасности новых бифункциональных молекул.

Пример 15. Модификация бифункциональных молекул

[0154] В данном примере исследовали некоторые модифицированные бифункциональные молекулы (Таблица 15) на их *in vitro* эффективность функционального анализа на TGF-β. Некоторые из них включали линкерную последовательность повторов TAGHTQTSTGGGAIITGTSGAGHGP (SEQ ID NO:87), HYP и/или G4S (SEQ ID NO:86). Эти молекулы называют от LP008-02-1 до LP008-02-7, соответственно.

Таблица 15. Конструирование модифицированных последовательностей линкера и TGF-β RII

Название	Последовательности (без указания части антитела)	SEQ ID NO:
1	<u>GGGGSGGGSGGGSGGGSGIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRE</u> <u>STCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILE</u> <u>DAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD</u>	79
2	<u>GGGGSTAGHTQTSTGGGAIITGTSGAGHGPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT</u> <u>SICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPCKIMKEKKKPG</u> <u>ETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD</u>	80
3	<u>GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSTAGHTQTSTGGGAIITGTSGAGHGPQLCKFC</u> <u>DVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHD</u> <u>FILEDAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD</u>	81
4	<u>GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSTAGHTQTSTGGGAIITGTSGAGHGPQLCKFC</u> <u>DVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHD</u> <u>FILEDAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFS</u>	82
5	<u>SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHYPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITS</u> <u>ICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPCKIMKEKKKPGE</u> <u>TFFMCSCSSDECNDNIIFS</u>	83
6	<u>SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHYPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITS</u> <u>ICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPCKIMKEKKKPGE</u> <u>TFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD</u>	84

7	<u>GGGGS</u> <u>GGGGS</u> <u>GGGGS</u> <u>HYPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV</u> <u>CVA</u> <u>VWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA</u> <u>SPKCMKEKKKPGETFFM</u> <u>CSCSSDE</u> <u>CNDNIIFSEEYNTSNPD</u>	85
8	<u>GGGGS</u>	86
9	<u>EEYNTSNPD</u>	90

ИФА с рекомбинантным TGF-β1 человека

[0155] Чтобы оценить связывающую активность модифицированных бифункциональных молекул LP008-02, эти бифункциональные молекулы были протестированы с помощью ELISA.

[0156] Вкратце, микротитрационные планшеты покрывали белком TGF-β1 человека (Асго, TG1-H4212) при концентрации 1 мкг/мл в PBS, 100 мкл/лунку при температуре 4 °С в течение ночи, затем блокировали с помощью 150 мкл/лунку 1% BSA. В каждую лунку добавляли трехкратные разведения модифицированных бифункциональных молекул LP008-02, начиная с 30 нМ, и инкубировали в течение 1 часа при 37°С. Планшеты промывали ФБР/Tween, а затем инкубировали с антителом козы против IgG человека (H+L), конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 30 минут при 37°С. После промывки планшеты проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали с помощью спектрофотометра при ОП 450 нм.

[0157] Как показано на **ФИГ. 19**, все модифицированные бифункциональные молекулы LP008-02, связанные с TGF-β1 человека с высокой активностью, сопоставимы с LP008-02-1.

Функциональный анализ TGF-β

[0158] Серийные разведения модифицированных бифункциональных молекул LP008-02 инкубировали с 293 клетками, трансфицированными репортером люциферазы SBE, в течение примерно 22 часов в присутствии рекомбинантного TGF-β1 человека.

[0159] Как показано на **ФИГ. 20**, LP008-02-2, LP008-02-3 и LP008-02-4 эффективно блокировали каноническую передачу сигналов TGF-β (IC₅₀ = 0,1435 нМ, IC₅₀=0,1639 нМ, IC₅₀=0,1882 нМ) в системе анализа репортера люциферазы TGF-β SBE, сконструированной из 293 клеток, которую сравнивали с LP008-02-1.

Пример 16. Сравнение бифункциональных молекул

[0160] Молекулы 1-7 таблицы 15 включают различные последовательности на N- и C-концах эктодомена (SEQ ID NO:72). Они были протестированы на стабильность и активность для оценки воздействия этих последовательностей.

[0161] Молекула 1 (LP008-02-1) включала всю внеклеточную часть белка (SEQ ID NO:61), которая содержала 25 аминокислот (IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP, SEQ ID NO:89, или аминокислоты 24-48 изоформы B, SEQ ID NO:71) из N-конца внеклеточного домена, и C-концевой фрагмент (EEYNTSNPD, SEQ ID NO:90). Кроме того, в эту молекулу были добавлены несколько повторов G4S (SEQ ID NO:86) в линкере.

[0162] В молекуле 2 (LP008-02-2) по сравнению с молекулой 1 заменена N-концевая часть (аминокислоты 24-48 изоформы B, SEQ ID NO:89) внеклеточного домена искусственным линкером TAGHTQTSTGGGAIITGTSGAGHGP (SEQ ID NO:87). Этот линкер был смоделирован на основе SEQ ID NO:89. Изменения включали (i) удаление жесткого дипептида PP, (ii) удаление потенциальных сайтов расщепления QK, N и K, (iii) включение нескольких остатков глицина для повышения гибкости, (iv) частичное удаление гидрофобных остатков (например, сохранение только одного I). Эти изменения отражены в таблице 16 ниже. Молекула 2 также включала один фрагмент G4S на N-конце.

Таблица 16. Искусственный линкер

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
Оригинал	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP	89
Модифицированный	TAGHTQTSTGGGAIITGTSGAGHGP	87

[0163] Молекула 3 (LP008-02-3) включала более длинный линкер G4S, чем молекула 2. В верхней части молекулы 3 молекула 4 (LP008-02-4) имела делецию C-концевого фрагмента, EEYNTSNPD (SEQ ID NO:90). В молекуле 5 (LP008-02-5) заменен искусственный линкер, SEQ ID NO:87, коротким линкером HYP. Молекулы 6 (LP008-02-6) и 7 (LP008-02-7) включали различные длины линкера G4S на N-концевой стороне линкера HYP.

Пример 17. Активность связывания и стабильность бифункциональных молекул

[0164] В данном примере использовали эксклюзионную ВЭЖХ и CE-SDS для оценки стабильности некоторых модифицированных бифункциональных молекул, включая LP008-02-1, и четырех других модифицированных молекул, LP008-02-2, LP008-02-3, LP008-02-6 и LP008-02-7.

[0165] 5 последовательностей экспрессировали в клетках CHO-K1 с помощью опосредованной полиэтилененимином (PEI) переходной трансфекции, и супернатант собирали через 10 дней. Бифункциональные молекулы очищали из культурального супернатанта с помощью белка А, а затем очищали с помощью Superdex 200pg с уровнем чистоты более 99%, как обнаружено с помощью эксклюзионной ВЭЖХ (Таблица 17).

Таблица 17. Результаты эксклюзионной ВЭЖХ и CE-SDS исследуемого препарата в день 0

ID образца	Буфер	Эксклюзионная ВЭЖХ			Невосстанавливающий CE-SDS			Восстанавливающий CE-SDS		
		HMW %	Моно %	LMW %	HMW %	Основной %	LMW %	LC %	LMW %	HC %
LP008-02-1	А	0,32	99,56	0,12	НО	94,5	5,5	24,0	2,3	73,7
LP008-02-2		0,37	99,58	0,05	НО	97,7	2,3	24,3	0,5	75,2
LP008-02-3		0,31	99,64	0,05	НО	97,0	3,0	24,5	0,9	74,6
LP008-02-6		0,35	99,62	0,03	НО	97,2	2,8	24,0	1,1	74,9
LP008-02-7		0,41	99,54	0,05	НО	97,2	2,8	23,8	0,9	75,3
LP008-02-1	В	0,25	99,72	0,03	НО	94,2	5,8	23,8	2,4	73,8
LP008-02-2		0,32	99,65	0,03	НО	97,5	2,5	23,9	0,6	75,6
LP008-02-3		0,26	99,72	0,03	НО	97,8	2,2	23,9	1,7	74,4
LP008-02-6		0,31	99,68	0,02	НО	97,1	2,9	23,8	1,0	75,2
LP008-02-7		0,39	99,58	0,03	НО	96,7	3,3	24,1	0,9	75,0

[0166] Чтобы оценить связывающую активность модифицированных бифункциональных молекул LP008-02, эти бифункциональные молекулы были протестированы с помощью ELISA.

[0167] Вкратце, микротитрационные планшеты покрывали белком TGF- β 1 человека (Asco, TG1-H4212) при концентрации 1 мкг/мл в PBS, 100 мкл/лунку при температуре 4 °С в течение ночи, затем блокировали с помощью 150 мкл/лунку 1% BSA. В каждую лунку добавляли четырехкратные серийные разведения модифицированных бифункциональных молекул LP008-02, начиная с 30 нМ, и инкубировали в течение 1 часа. Планшеты промывали ФБР/Tween, а затем инкубировали с антителом козы против Fc IgG человека, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 30 минут. После промывки планшет инкубировали с субстратом ТМВ для развития цвета и анализировали с помощью спектрофотометра при ОП 450 нм.

[0168] Как показано на **ФИГ. 21**, все другие модифицированные бифункциональные молекулы LP008-02 связываются с TGF- β 1 человека с высокой активностью, которая сопоставима с LP008-02-1.

[0169] Для оценки эффекта модифицированных бифункциональных молекул LP008-02 в отношении канонической передачи сигналов TGF- β модифицированные бифункциональные молекулы испытывали с помощью анализа люциферазы. Серийные разведения бифункциональных молекул инкубировали с 293 клетками, трансфицированными репортером люциферазы SBE, в течение 24 часов в присутствии рекомбинантного TGF- β 1 человека. Как показано на **ФИГ. 22**, такие как LP008-02-1, LP008-02-2, LP008-02-3, LP008-02-6 и LP008-02-7 эффективно блокировали каноническую передачу сигналов TGF- β (IC_{50} = 0,04231 нМ, IC_{50} = 0,0527 нМ, IC_{50} = 0,09616 нМ и IC_{50} = 0,1962 нМ) в системе анализа репортера люциферазы TGF- β SBE, сконструированной в 293 клетках.

[0170] Бифункциональные молекулы отдельно растворяли в двух буферах для обнаружения стабильности антител. Информация о буфере указана следующим образом: буфер А: 20 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, 250 мМ сорбит, 0,02% полисорбат 80, pH 4,9; буфер В: 20 мМ His/His-HCl, 250 мМ трегалоза, pH 5,4.

[0171] Подготовленные образцы с концентрацией 3,0 мг/мл инкубировали при 40°C, а затем детектировали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ и CE-SDS в день 0 и день 14, соответственно. Как показано в Таблице 18, LP008-02-2, LP008-02-3, LP008-02-6 и LP008-02-7, приготовленные как в буфере А, так и в буфере В, имеют более высокую

стабильность, чем LP008-02-1 в эксклюзивной ВЭЖХ, невосстанавливаемом CE-SDS и восстанавливаемом CE-SDS.

Таблица 18. Результаты эксклюзивной ВЭЖХ и CE-SDS исследуемого препарата на 14 день

ID образца	Буфер	Эксклюзивная ВЭЖХ			Невосстанавливающий CE-SDS			Восстанавливающий CE-SDS		
		HMW (%)	Моно (%)	LMW (%)	HMW (%)	Основной (%)	LMW (%)	LC (%)	LMW (%)	HC (%)
LP008-02-1	А	0,77	43,74	55,49	НО	66,1	33,9	25,8	31,0	43,1
LP008-02-2		0,83	98,40	0,77	НО	95,0	5,0	25,2	1,1	73,7
LP008-02-3		0,67	97,99	1,34	0,2	89,5	10,3	25,5	7,2	67,3
LP008-02-6		0,89	98,39	0,72	НО	94,1	5,9	25,2	3,8	71,0
LP008-02-7		1,40	98,11	0,49	0,1	92,4	7,5	25,6	2,6	71,9
LP008-02-1	В	0,41	22,01	77,59	0,1	33,4	66,4	26,8	53,0	20,2
LP008-02-2		0,46	98,81	0,73	0,1	93,2	6,7	25,2	4,1	70,7
LP008-02-3		0,39	98,9	0,71	0,4	82,3	17,4	25,6	17,3	57,1
LP008-02-6		1,10	98,33	0,58	0,2	91,9	7,9	25,5	5,8	68,6
LP008-02-7		0,82	98,65	0,52	0,6	93,2	6,2	25,2	2,0	72,9

[0172] Таким образом, этот пример показывает, что модифицированные бифункциональные молекулы LP008-02-2, LP008-02-3, LP008-02-6 и LP008-02-7 проявляли сходную активность с LP008-02-1, и все же имели значительно более высокую стабильность, чем LP008-02-1. Замена N-концевой части (IPRHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP, SEQ ID NO:89) TGF-β RII в LP008-02-1 с помощью искусственного линкера (например, TAGHTQTSTGGGAITTTGTSAGHGHP (SEQ ID NO:87) или HYP) привела к значительному повышению стабильности.

Пример 18. Состав с высокой концентрацией антител против PD-L1

[0173] В этом примере использовали тесты HIC-HPLC и вязкости для оценки потенциала и риска в разработке высококонцентрированных составов молекул против PD-L1.

[0174] Четыре молекулы против PD-L1 экспрессировались в клетках CHO-K1 или 293F с помощью транзиторной трансфекции. Константные области тяжелой цепи представляют собой IgG1(N297A)-Fc человека. Очищенные антитела MPDL3280A (Атезолизумаб), 47C6A3, Hu67F3G7-22 и Hu89C10H8-7 тестировали с помощью НИС-НPLC, и получали концентрацию сульфата аммония, соответствующую времени гидрофобного элюирования, которая использовалась для прогнозирования диапазона растворимости этих молекул. Как показано в Таблице 19, концентрация сульфата аммония, соответствующая времени гидрофобного элюирования MPDL3280A, 47C6A3, Hu67F3G7-22 и Hu89C10H8-7, составляет 0,41M, 0,78M, 0,97M и 1,10 M соответственно. Все вновь разработанные антитела обладают более низкой гидрофобностью, чем эталонное антитело MPDL3280A.

Таблица 19. Гидрофобность антител по результатам теста НИС-НPLC

Образец	НИС(М)
MPDL3280A	0,41
47C6A3	0,78
Hu67F3G7-22	0,97
Hu89C10H8-7	1,10

[0175] Затем измеряли активность антител против PD-L1 в блокировании взаимодействия PD1/PD-L1 с помощью биoluminesцентного клеточного анализа. В этом анализе, когда эффекторные клетки PD1 совместно культивируют с клетками-мишенями PD-L1, взаимодействие PD-1/PD-L1 ингибирует передачу сигналов TCR и NFAT-RE-опосредованную люминесценцию. Добавление либо антитела против PD-1, либо антитела против PD-L1, которое блокирует взаимодействие PD-1/PD-L1, высвобождает ингибирующий сигнал и приводит к активации TCR и NFAT-RE-опосредованной люминесценции. Как показано на **ФИГ. 23**, MPDL3280A, 47C6A3, Hu67F3G7-22 и Hu89C10H8-7 блокировали взаимодействие PD1 и PD-L1 со значительно высокой активностью (MPDL3280A EC₅₀= 0,1327 нМ, 47C6A3 EC₅₀ = 0,1501нМ, Hu67F3G7-22 EC₅₀= 0,1034нМ, Hu89C10H8-7 EC₅₀= 0,2138нМ).

[0176] MPDL3280A и Hu67F3G7-22 с Fc IgG1 человека экспрессировались в клетках CHO-K1 путем транзиторной трансфекции. Очищенные антитела MPDL3280A-hIgG1 Fc и Hu67F3G7-22-hIgG1 Fc тестировали с помощью НИС-НPLC, и получали концентрацию сульфата аммония, соответствующую времени гидрофобного элюирования, которая использовалась для прогнозирования диапазона растворимости

двух молекул. Как показано в Таблице 20, концентрация сульфата аммония, соответствующая времени гидрофобного элюирования Fc MPDL3280A-hIgG1 и Fc Hu67F3G7-22-hIgG1, составляет 0,42М и 0,99М соответственно. Опять же, с тем же фрагментом Fc, Hu67F3G7-22 демонстрировал более низкую гидрофобность, чем MPDL3280A.

Таблица 20. Результаты теста ИС-HPLC

Образец	Темп.	ИС
		(NH ₄) ₂ SO ₄ -М
MPDL3280A-hIgG1 Fc	25°C	0,42
Hu67F3G7-22-hIgG1 Fc		0,99

[0177] Для дополнительного подтверждения растворимости и вязкости антител два очищенных кандидата концентрировали непосредственно в фосфатном буфере (включая 60 mM NaCl) путем ультрафильтрации. Во время процесса ультрафильтрации на разных стадиях измеряли концентрацию, эксклюзионную ВЭЖХ и вязкость. Как показано в Таблице 21, вязкость Fc MPDL3280A -hIgG1 намного выше, чем у Fc Hu 67F3G7-22-hIgG1 при аналогичных концентрациях. И для высококонцентрированного состава, как правило, антитела с более низкой вязкостью являются предпочтительными по сравнению с антителами с более высокой вязкостью. Соответственно, в качестве терапевтического белка антитело Hu67F3G7-22 обладает более высоким потенциалом, чем MPDL3280A.

Таблица 21. Результаты теста растворимости

Образец	Буфер	Темп.	Конц.			SEC (%)			Вязкость мПа•С-1
			мг/мл	A260/280	A320	HMW	Моно	LMW	
MPDL3280A -hIgG1 Fc	PB +60 мМ NaCl	25°C	118,41	0,52	0,159	0,97	99,03	0	7,01
			141,37	0,52	0,222	1,31	98,69	0	16,1
			183,42	0,52	0,239	1,35	98,65	0	60,01
Hu67F3G7- 22-hIgG1 Fc	PB +60 мМ NaCl		119	0,5	0,189	0,88	99,12	0	2,96
			139,34	0,5	0,183	1,35	98,65	0	4,995
			180,32	0,5	0,25	1,43	98,57	0	14,56

* * *

[0178] Настоящее изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными описанными вариантами реализации, которые предназначены для единичного иллюстрирования отдельных аспектов настоящего изобретения, и любые композиции

или способы, которые функционально эквивалентны, входят в объем настоящего изобретения. Для специалистов в данной области техники должно быть понятно, что можно сделать различные модификации и варианты способов и композиций в соответствии с настоящим изобретением, не отклоняясь от сущности или объема настоящего изобретения. Таким образом, подразумевается, что настоящее изобретение охватывает его модификации и вариации при условии, что они входят в объем прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов.

[0179] Все публикации и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены в настоящую заявку посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретным и индивидуальным образом включена посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Многофункциональная молекула, содержащая антитело против PD-L1 (лиганд запрограммированной гибели клеток 1) или его фрагмент и внеклеточный домен TGF- β RII человека (TGF-бета-рецептор типа 2),

при этом антитело против PD-L1 или его фрагмент обладают специфичностью к белку PD-L1 человека и содержат переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, соответственно, содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7-12 или SEQ ID NO:13-18, или при этом CDR1 VH содержит SEQ ID NO:19, CDR2 VH содержит SEQ ID NO:20, 91 или 92, CDR3 VH содержит SEQ ID NO:21, CDR1 VL содержит SEQ ID NO:22, CDR2 VL содержит SEQ ID NO:23 и CDR3 VL содержит SEQ ID NO:24 или 93, при этом внеклеточный домен TGF- β RII человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72 и слит с антителом против PD-L1 или его фрагментом.

2. Многофункциональная молекула по п. 1, отличающаяся тем, что антитело против PD-L1 или его фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую VH, и отдельную легкую цепь, содержащую VL.

3. Многофункциональная молекула по п. 2, отличающаяся тем, что внеклеточный домен TGF- β RII слит с тяжелой цепью антитела против PD-L1 или его фрагмента.

4. Многофункциональная молекула по п. 3, отличающаяся тем, что внеклеточный домен TGF- β RII слит с С-концом тяжелой цепи антитела против PD-L1 или его фрагмента.

5. Многофункциональная молекула по п. 3 или 4, отличающаяся тем, что внеклеточный домен TGF- β RII слит с тяжелой цепью антитела против PD-L1 или его фрагмента через пептидный линкер.
6. Многофункциональная молекула по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что внеклеточный домен TGF- β RII содержит SEQ ID NO:72 и включает по меньшей мере частичную делецию аминокислотных остатков 24-48 последовательности SEQ ID NO:71.
7. Многофункциональная молекула по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что внеклеточный домен TGF- β RII содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:61 и 73-78, причем для SEQ ID NO:74 X представляет собой любую аминокислоту, кроме K, S или N.
8. Многофункциональная молекула по любому из пп. 1-5, которая включает по меньшей мере 30 аминокислотных остатков между SEQ ID NO:72 и антителом против PD-L1 или его фрагментом.
9. Многофункциональная молекула по любому из пп. 1-5, которая включает мотив альфа-спирали между SEQ ID NO:72 и антителом против PD-L1 или его фрагментом.
10. Многофункциональная молекула по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, соответственно, содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13-18.
11. Многофункциональная молекула по п. 10, отличающаяся тем, что VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID

NO:31-37, а VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:38-43.

12. Многофункциональная молекула по п. 11, отличающаяся тем, что VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43.

13. Многофункциональная молекула по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что CDR1 VH содержит SEQ ID NO:19, CDR2 VH содержит SEQ ID NO:20, 91 или 92, CDR3 VH содержит SEQ ID NO:21, CDR1 VL содержит SEQ ID NO:22, CDR2 VL содержит SEQ ID NO:23 и CDR3 VL содержит SEQ ID NO:24 или 93.

14. Многофункциональная молекула по п. 13, отличающаяся тем, что VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:44-49 и 57-58, а VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:50-56.

15. Многофункциональная молекула по п. 13, отличающаяся тем, что VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48, 57 или 58, и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53 или 56.

16. Многофункциональная молекула по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, соответственно, содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO:19, 92, 21, 22, 23 и 93.

17. Многофункциональная молекула по п. 16, отличающаяся тем, что VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58, и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56.

18. Многофункциональная молекула по любому из пп. 1-17, которая содержит легкую цепь, содержащую VL и константную область легкой цепи, и тяжелую цепь, содержащую VH, константную область тяжелой цепи, пептидный линкер и внеклеточный домен TGF- β RII.

19. Многофункциональная молекула по п. 18, отличающаяся тем, что константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59.

20. Антитело против PD-L1 (лиганд запрограммированной гибели клеток 1) или его фрагмент, которое обладает специфичностью к белку PD-L1 человека и содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, соответственно, содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7-12 или SEQ ID NO:13-18 или при этом CDR1 VH содержит SEQ ID NO:19, CDR2 VH содержит SEQ ID NO:20, 91 или 92, CDR3 VH содержит SEQ ID NO:21, CDR1 VL содержит SEQ ID NO:22, CDR2 VL содержит SEQ ID NO:23 и CDR3 VL содержит SEQ ID NO:24 или 93.

21. Антитело против PD-L1 или его фрагмент по п. 20, отличающиеся тем, что CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, соответственно, содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13-18.

22. Антитело против PD-L1 или его фрагмент по п. 21, отличающиеся тем, что VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:31-37, а VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:38-43.

23. Антитело против PD-L1 или его фрагмент по п. 21, отличающиеся тем, что VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43.

24. Антитело против PD-L1 или его фрагмент по п. 20, отличающиеся тем, что CDR1 VH содержит SEQ ID NO:19, CDR2 VH содержит SEQ ID NO:20, 91 или 92, CDR3 VH содержит SEQ ID NO:21, CDR1 VL содержит SEQ ID NO:22, CDR2 VL содержит SEQ ID NO:23 и CDR3 VL содержит SEQ ID NO:24 или 93.

25. Антитело против PD-L1 или его фрагмент по п. 24, отличающиеся тем, что VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:44-49 и 57-58, а VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:50-56.

26. Антитело против PD-L1 или его фрагмент по п. 24, отличающиеся тем, что CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, соответственно, содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO:19, 92, 21, 22, 23 и 93.

27. Антитело против PD-L1 или его фрагмент по п. 26, отличающиеся тем, что VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58, и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56.

28. Антитело против PD-L1 или его фрагмент по п. 20, отличающиеся тем, что CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, соответственно, содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7-12.

29. Антитело против PD-L1 или его фрагмент по п. 28, отличающиеся тем, что VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:25-28, а VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:29-30.

30. Антитело против PD-L1 или его фрагмент по п. 28, отличающиеся тем, что VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26, 27 или 28, и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30.

31. Многофункциональная молекула, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, слитые через пептидный линкер с N-концом аминокислотной последовательности SEQ ID NO:72.

32. Многофункциональная молекула по п. 31, отличающаяся тем, что указанный пептидный линкер содержит гибкий линкер и/или замещающий пептид IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP (SEQ ID NO:89), причем указанный замещающий пептид отличается от SEQ ID NO:89.

33. Многофункциональная молекула по п. 32, отличающаяся тем, что замещающий пептид содержит аминокислотную последовательность IPPHVQXXVNNDMIVTDNXGAVKFP (SEQ ID NO:88), где X представляет собой любую аминокислоту, кроме K, S или N.

34. Многофункциональная молекула по п. 33, отличающаяся тем, что замещающий пептид имеет по меньшей мере 50% идентичность последовательности с SEQ ID NO:88.

35. Многофункциональная молекула по п. 32, отличающаяся тем, что указанный замещающий пептид содержит аминокислотную последовательность TAGHTQTSTGGGAITTTGTSGAGHGP (SEQ ID NO:87) или вариант, имеющий по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO:87, причем указанный вариант содержит по меньшей мере 4 G, не содержит дипептида PP, содержит не более 3 гидрофобных аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из I, L, M, F, V, W, Y и P.
36. Многофункциональная молекула по п. 35, отличающаяся тем, что указанный вариант включает по меньшей мере 5 G и не более 1 гидрофобного аминокислотного остатка, выбранного из группы, состоящей из I, L, M, F, V, W, Y и P.
37. Многофункциональная молекула по любому из пп. 32-36, отличающаяся тем, что гибкий линкер содержит S и по меньшей мере 50% G.
38. Многофункциональная молекула по п. 37, где гибкий линкер содержит один или более фрагментов GGGGS (SEQ ID NO:86).
39. Многофункциональная молекула по любому из пп. 31-38, отличающаяся тем, что С-концом антитела или его антигенсвязывающего фрагмента являются по меньшей мере 20 аминокислотных остатков из N-конца аминокислотной последовательности SEQ ID NO:72.
40. Многофункциональная молекула по любому из пп. 31-39, которая по меньшей мере не включает всю последовательность EYNTSNPD (SEQ ID NO:90).
41. Многофункциональная молекула по любому из пп. 31-40, отличающаяся тем, что антитело или его фрагмент специфичны к антигену, выбранному из группы,

состоящей из PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3, CD28, CD122, 4-1BB, TIM3, OX-40, OX40L, CD40, CD40L, LIGHT, ICOS, ICOSL, GITR, GITRL, TIGIT, CD27, VISTA, B7H3, B7H4, BTLA, CD4, CD2, CD8, CD47 и CD73.

42. Многофункциональная молекула по любому из пп. 31-41, отличающаяся тем, что указанное антитело или его фрагмент содержит Fc-фрагмент.

43. Многофункциональная молекула по п. 42, отличающаяся тем, что указанный пептидный линкер слит с С-концом Fc-фрагмента.

44. Клетка, содержащая один или более полинуклеотидов, кодирующих многофункциональную молекулу по любому из п. 1-19 и п. 31-43 или антитело или его фрагмент против PD-L1 по любому из п. 20-30.

45. Один или более полинуклеотидов, кодирующих многофункциональную молекулу по любому из п. 1-19 и п. 31-43 или антитело или его фрагмент против PD-L1 по любому из п. 20-30.

46. Композиция, содержащая многофункциональную молекулу по любому из пп. 1-19 и 31-43 или антитело против PD-L1 или его фрагмент по любому из пп. 20-30 и фармацевтически приемлемый носитель.

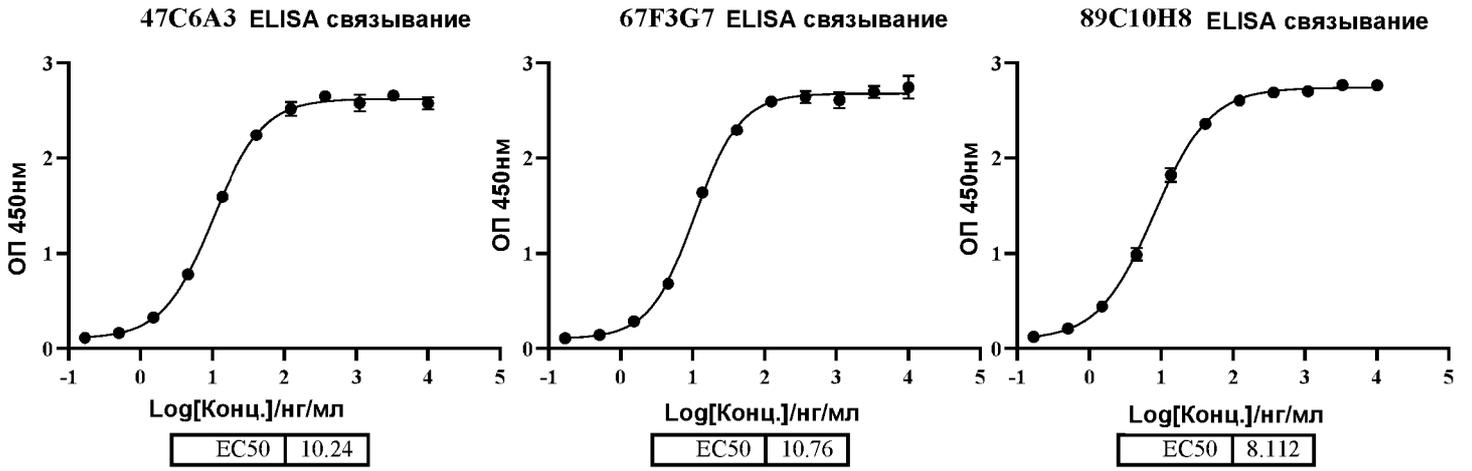
47. Применение многофункциональной молекулы по любому из пп. 1-19 и 31-43 или антитела против PD-L1 или его фрагмента по любому из пп. 20-30 для получения лекарственного средства для лечения рака.

48. Способ лечения рака у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту эффективного количества многофункциональной молекулы по

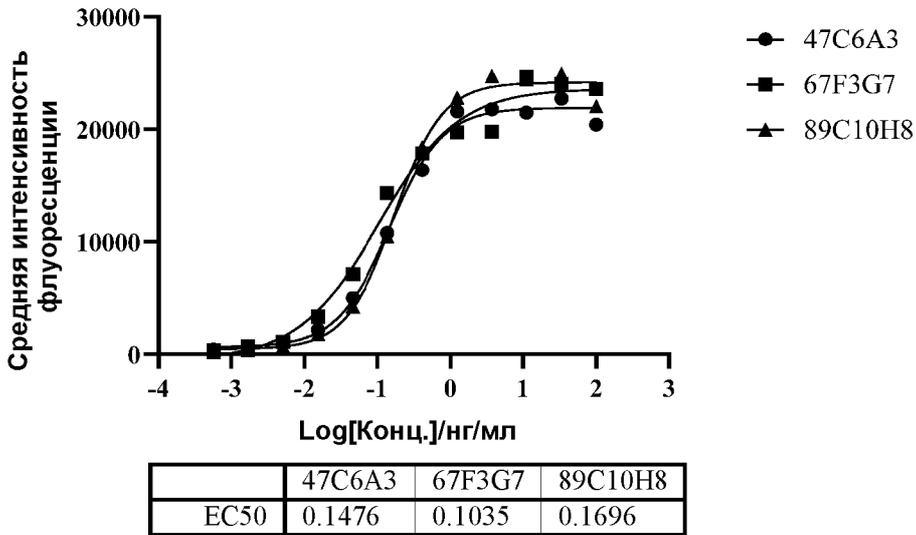
любому из пп. 1-19 и 31-43 или антитела против PD-L1 или его фрагмента по любому из пп. 20-30.

49. Применение по п. 47 или способ по п. 48, отличающиеся тем, что указанный рак представляет собой солидную опухоль.

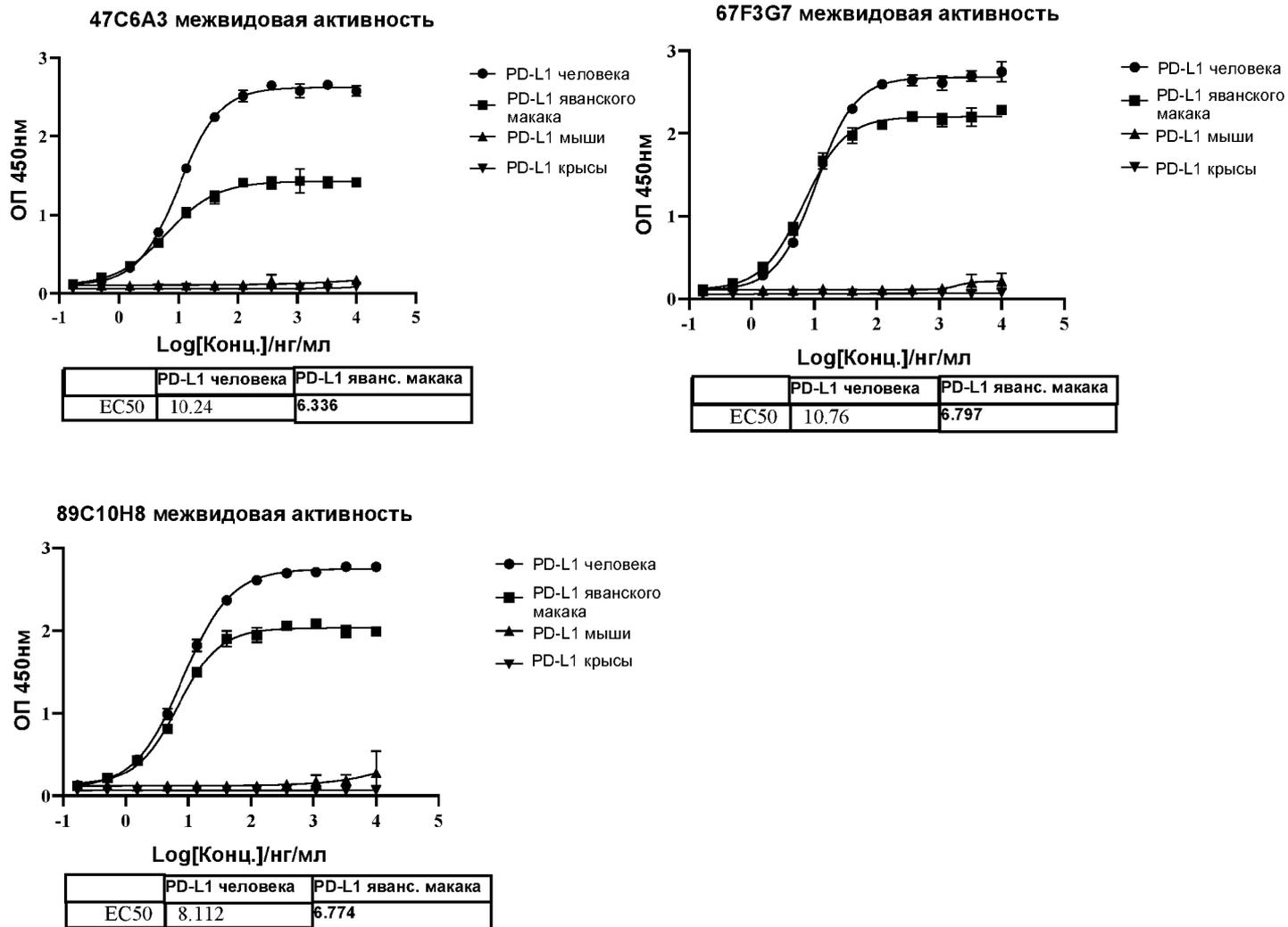
50. Применение по п. 47 или 49 или способ по п. 48 или 49, отличающийся тем, что отличающийся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака печени, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, рака эндометрия, лейкоза, лимфомы, рака поджелудочной железы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака уретры, рака головы и шеи, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака пищевода, рака яичника, рака почки, меланомы, рака предстательной железы и рака щитовидной железы.



ФИГ. 1



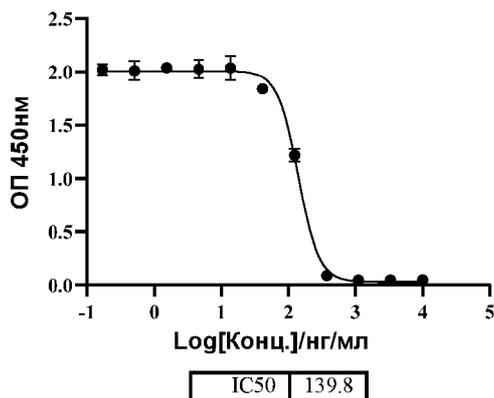
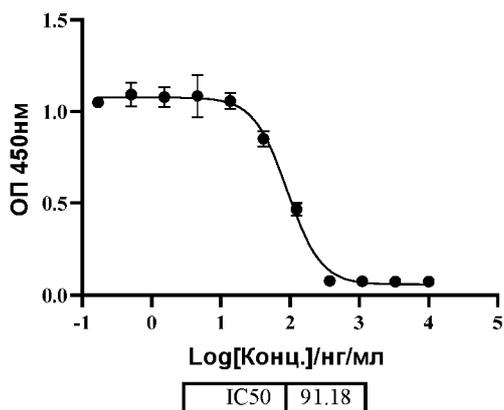
ФИГ. 2



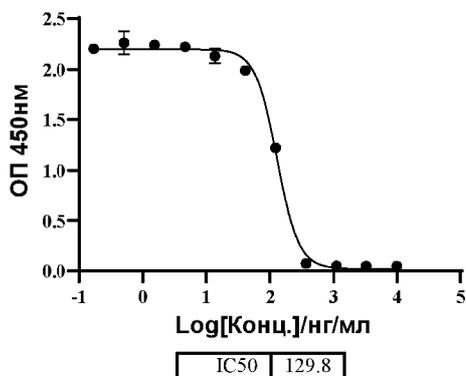
ФИГ. 3

47C6A3 анализ блокирования рецепторов Био- PD1

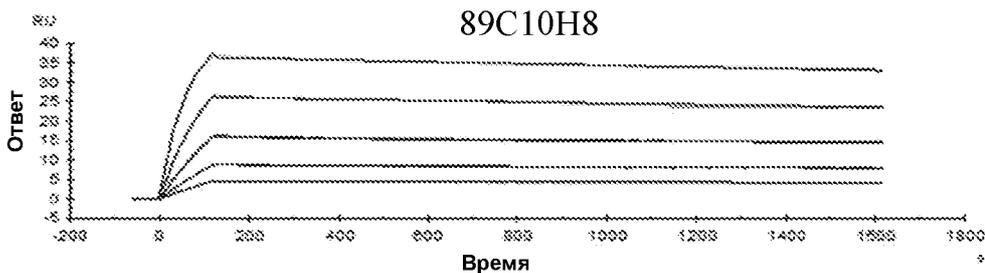
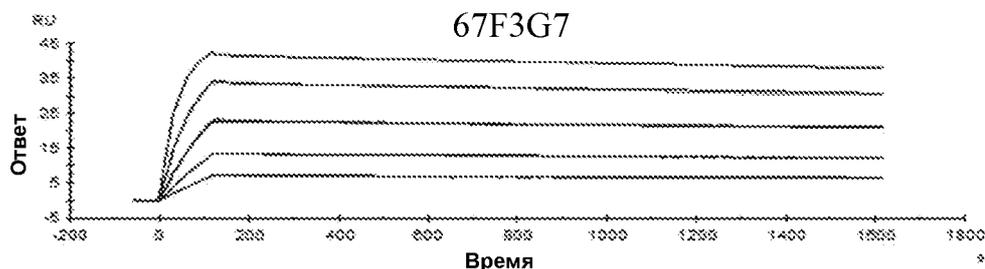
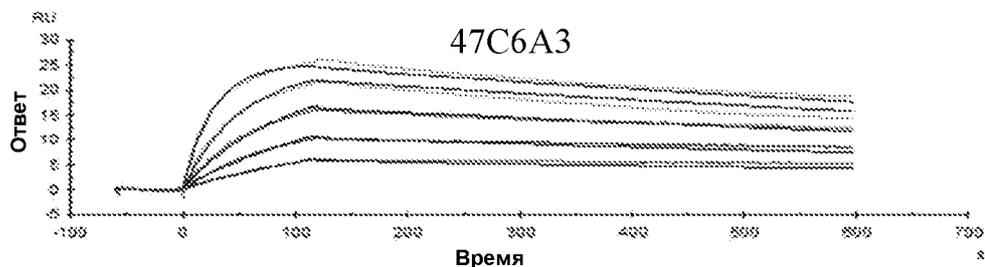
67F3G7 анализ блокирования рецепторов Био- PD1



89C10H8 анализ блокирования рецепторов Био- PD1

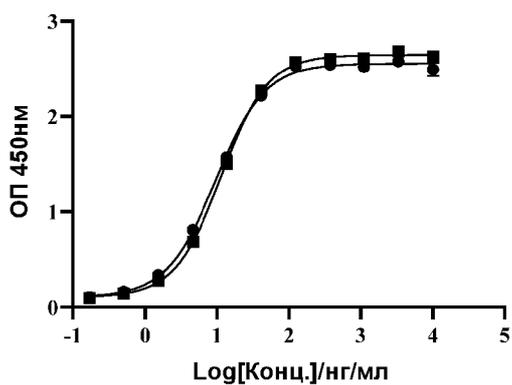


ФИГ. 4



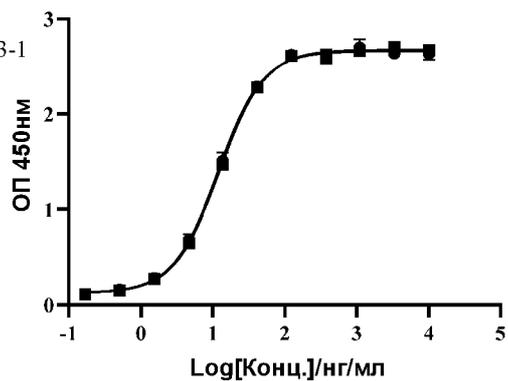
ФИГ. 5

Связывание покрытия hPD-L1 с HuAb в ELISA



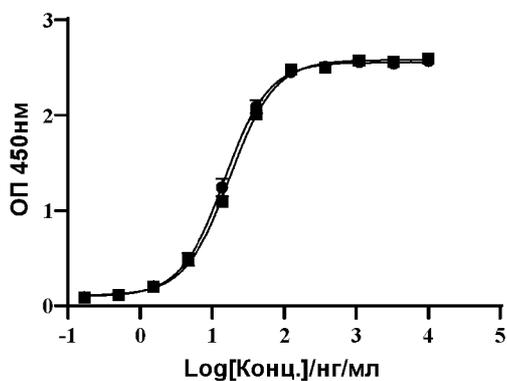
	Hu47C6A3-1	Химера
EC50	9.626	11.53

Связывание покрытия hPD-L1 с HuAb в ELISA



	Hu47C6A3-2	Химера
EC50	11.73	12.38

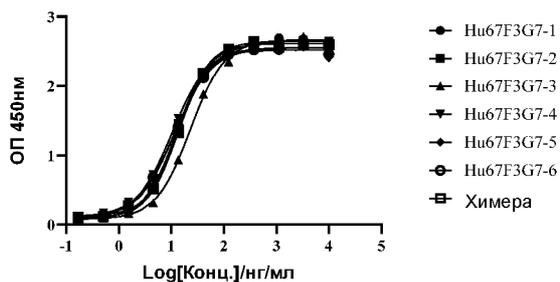
Связывание покрытия hPD-L1 с HuAb в ELISA



	Hu47C6A3-3	Химера
EC50	14.96	17.64

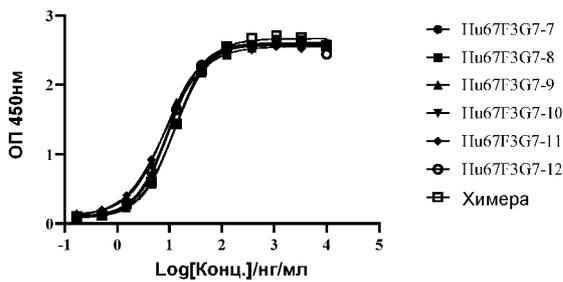
ФИГ. 6А

Связывание покрытия hPD-L1 с HuAb в ELISA



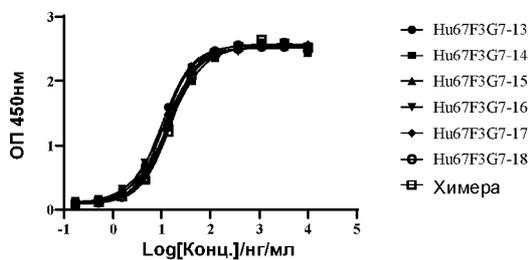
	Hu67F3G7-1	Hu67F3G7-2	Hu67F3G7-3	Hu67F3G7-4	Hu67F3G7-5	Hu67F3G7-6	Химера
EC50	12.48	13.17	23.21	10.59	13.30	11.79	14.15

Связывание покрытия hPD-L1 с HuAb в ELISA



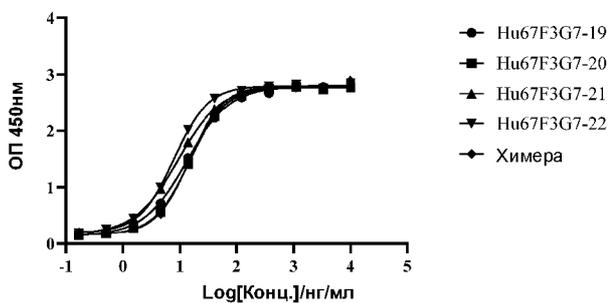
	Hu67F3G7-7	Hu67F3G7-8	Hu67F3G7-9	Hu67F3G7-10	Hu67F3G7-11	Hu67F3G7-12	Химера
EC50	12.44	12.49	8.448	10.08	8.247	9.533	12.89

Связывание покрытия hPD-L1 с HuAb в ELISA



	Hu67F3G7-13	Hu67F3G7-14	Hu67F3G7-15	Hu67F3G7-16	Hu67F3G7-17	Hu67F3G7-18	Химера
IC50	10.20	14.40	11.07	11.41	13.60	14.04	15.66

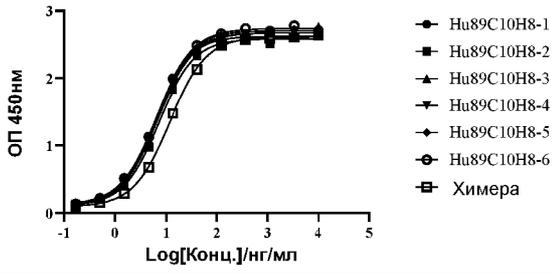
Связывание покрытия hPD-L1 с HuAb в ELISA



	Hu67F3G7-19	Hu67F3G7-20	Hu67F3G7-21	Hu67F3G7-22	Химера
EC50	13.19	14.65	9.189	7.799	14.75

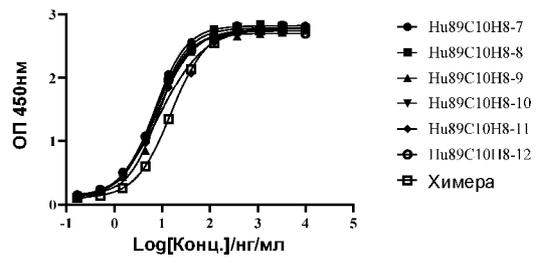
ФИГ. 6В

Связывание покрытия hPD-L1 с HuAb в ELISA



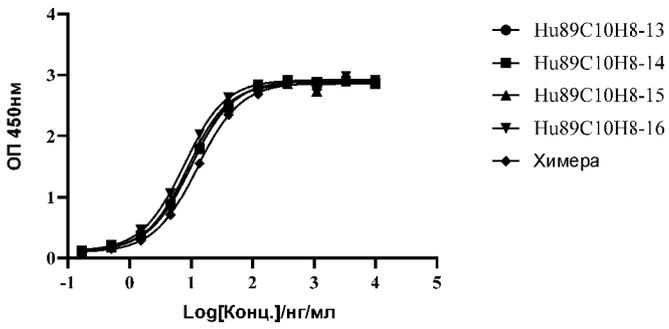
	Hu89C10H8-1	Hu89C10H8-2	Hu89C10H8-3	Hu89C10H8-4	Hu89C10H8-5	Hu89C10H8-6	Химера
EC50	6.218	7.278	6.655	6.828	6.372	6.509	11.98

Связывание покрытия hPD-L1 с HuAb в ELISA



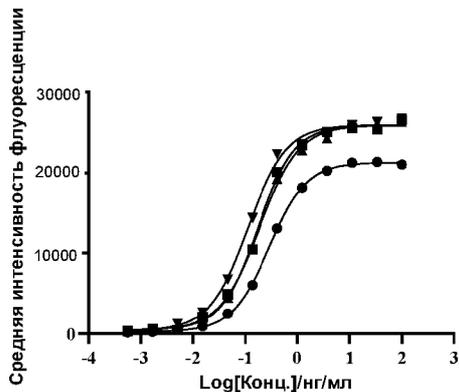
	Hu89C10H8-7	Hu89C10H8-8	Hu89C10H8-9	Hu89C10H8-10	Hu89C10H8-11	Hu89C10H8-12	Химера
EC50	7.053	7.410	8.422	7.815	8.779	7.035	15.65

Связывание покрытия hPD-L1 с HuAb в ELISA

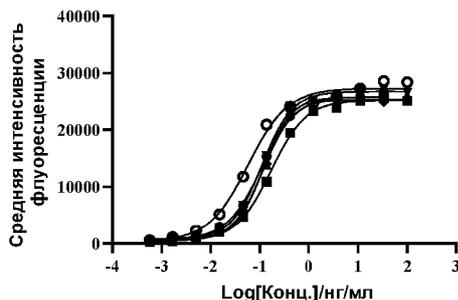


	Hu89C10H8-13	Hu89C10H8-14	Hu89C10H8-15	Hu89C10H8-16	Химера
EC50	9.943	9.833	8.800	7.569	12.62

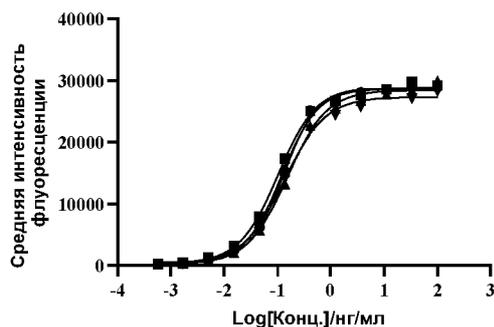
ФИГ. 6С



	Hu47C6A3-1	Hu47C6A3-2	Hu47C6A3-3	Химера
EC50	0.2908	0.1752	0.1875	0.1128

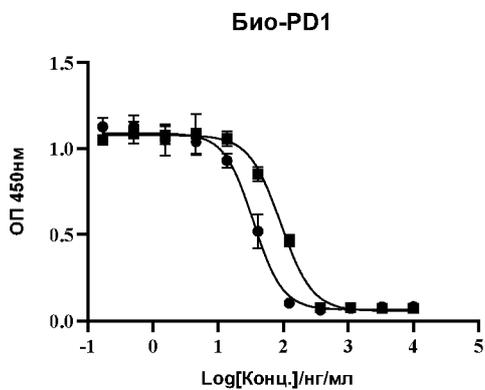


	Hu67F3G7-2	Hu67F3G7-3	Hu67F3G7-5	Hu67F3G7-7	Hu67F3G7-22	Химера
EC50	0.1076	0.1669	0.1152	0.1097	0.1180	0.05771

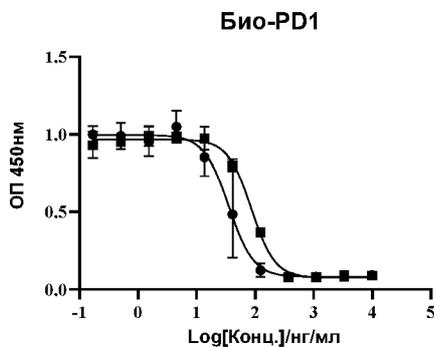


	Hu89C10H8-4	Hu89C10H8-7	Hu89C10H8-11	Hu89C10H8-12	Химера
EC50	0.1272	0.1003	0.1507	0.1305	0.1178

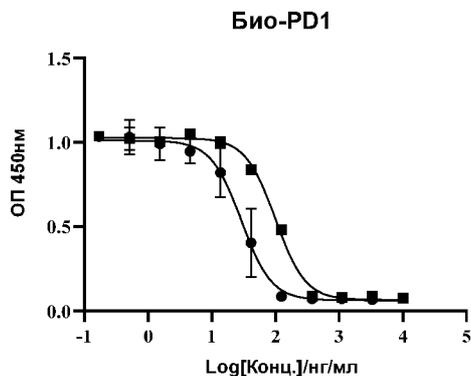
ФИГ. 7



	Hu47C6A3-1	Химера
IC50	34.92	91.18

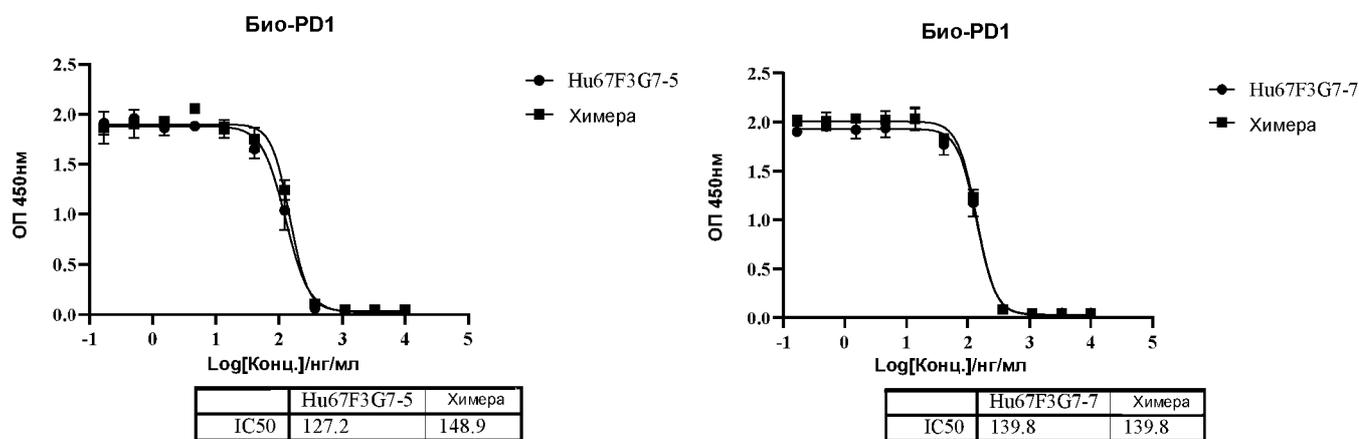
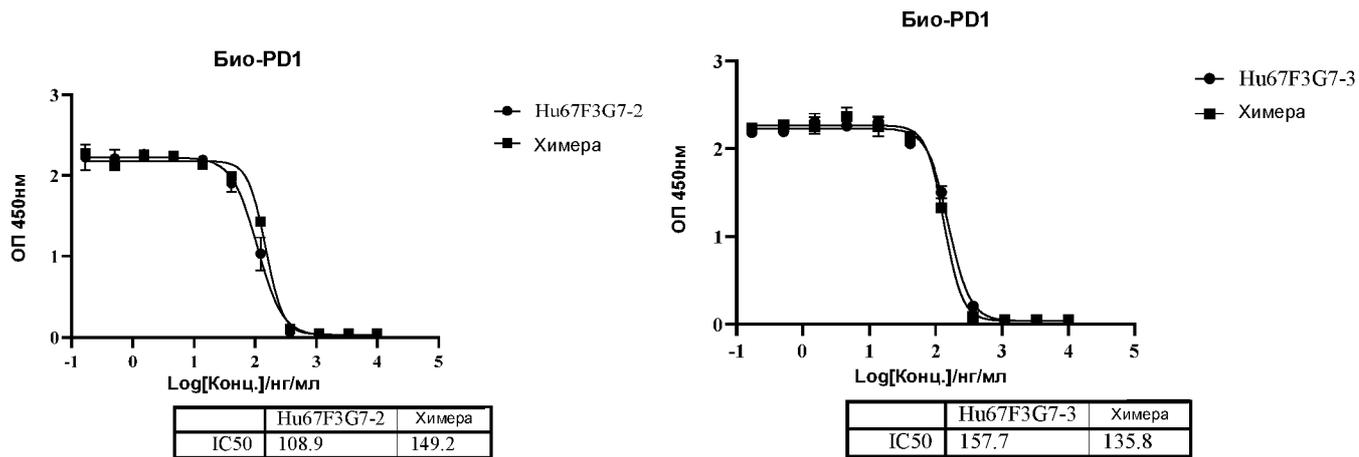


	Hu47C6A3-2	Химера
IC50	35.36	85.69

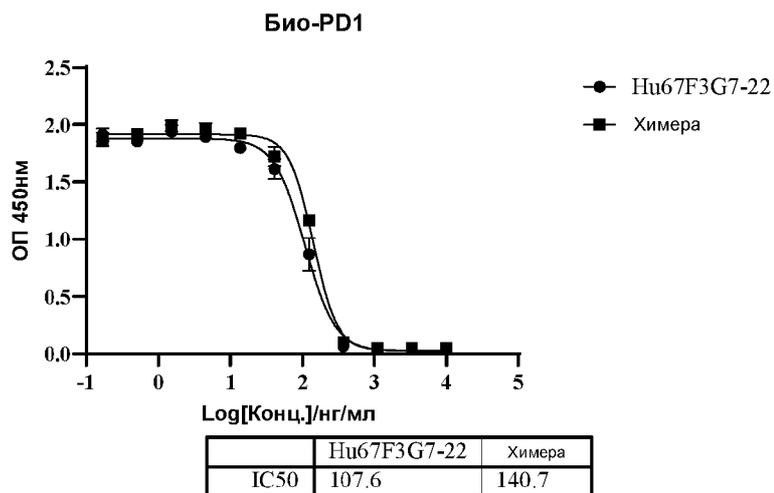


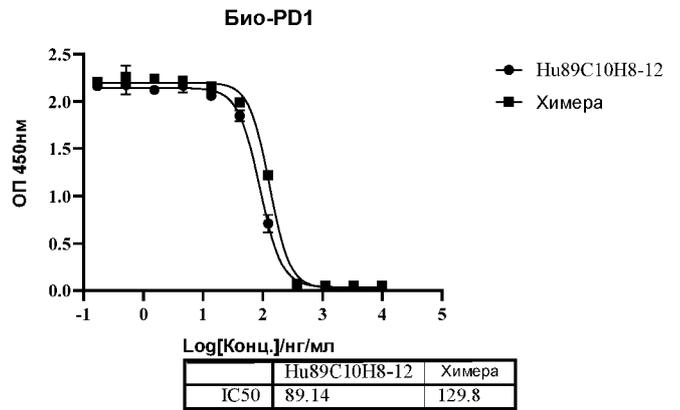
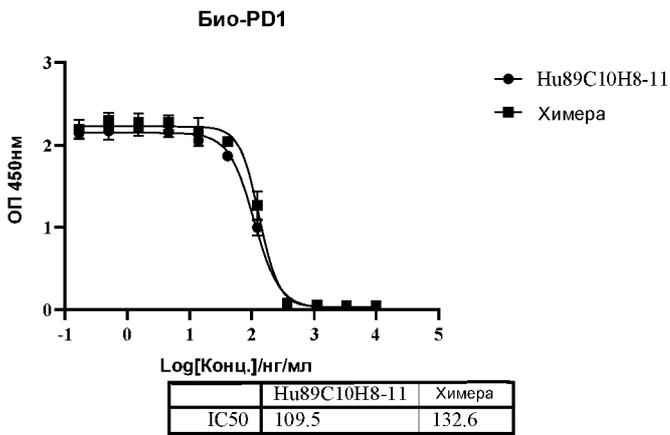
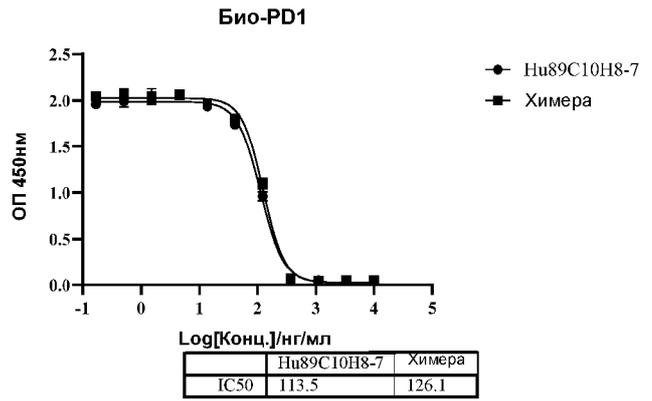
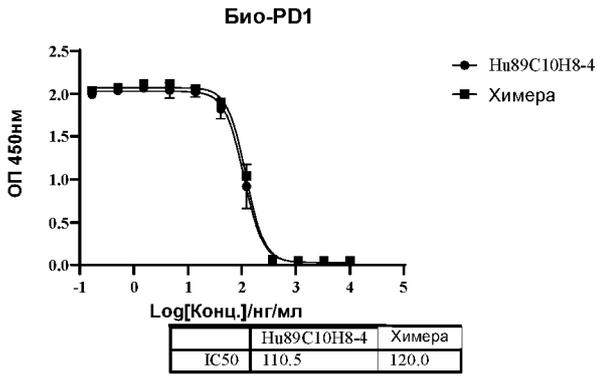
	Hu47C6A3-3	Химера
IC50	28.99	98.96

ФИГ. 8А

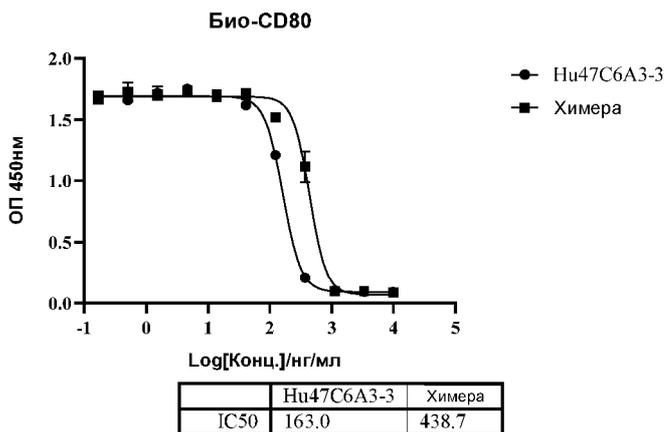
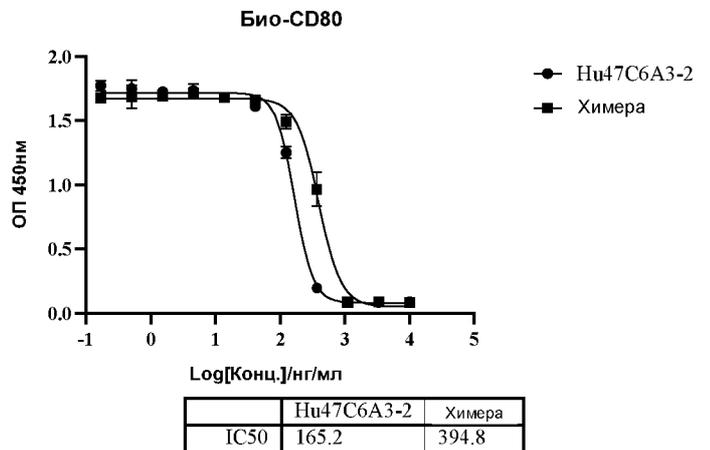
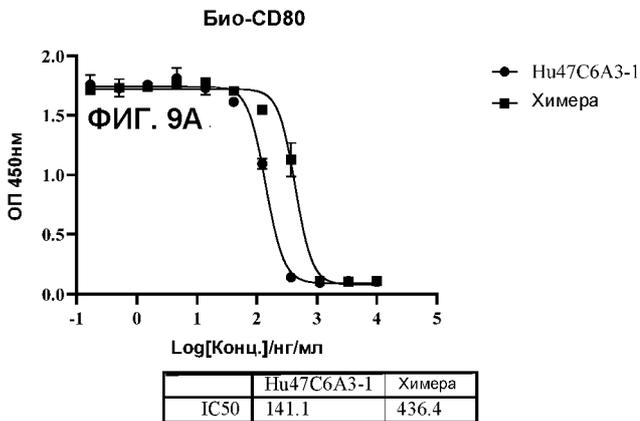


ФИГ. 8В

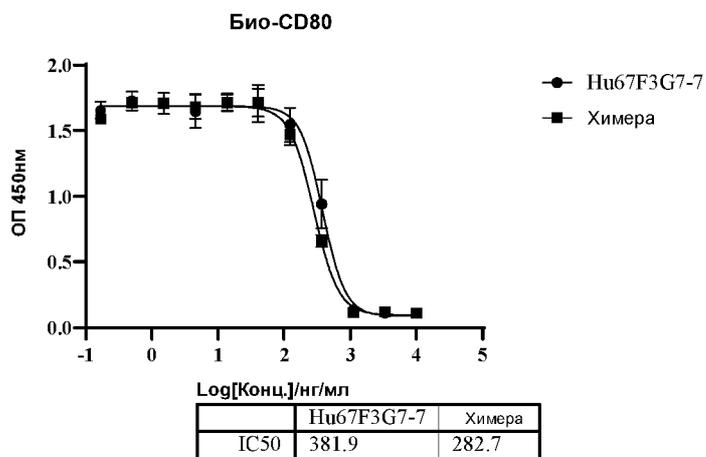
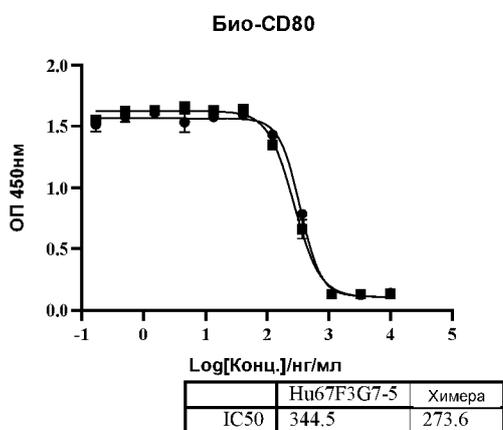
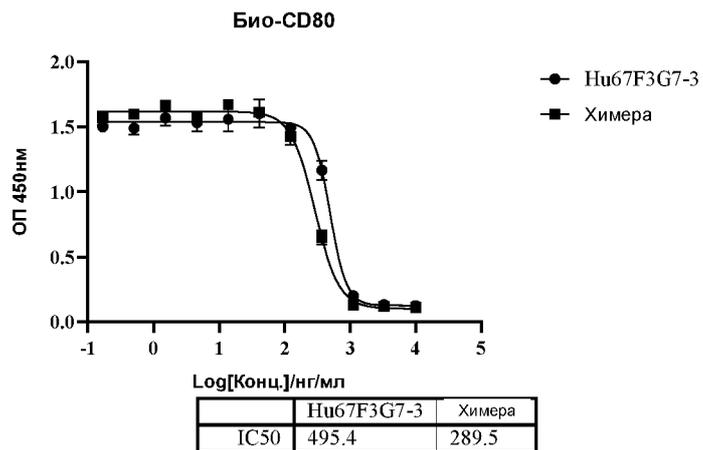
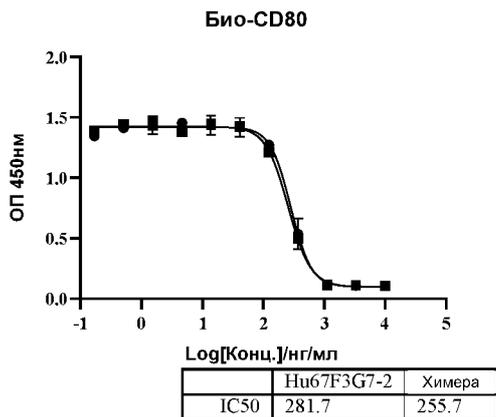
ФИГ. 8В
(продолж.)



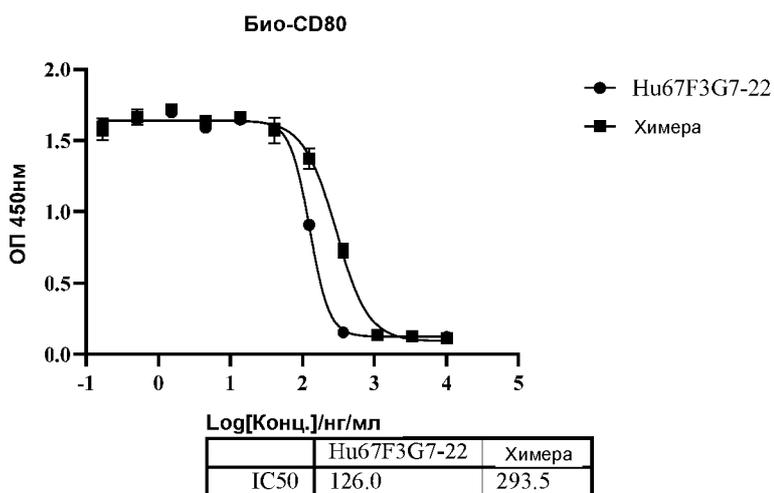
ФИГ. 8С



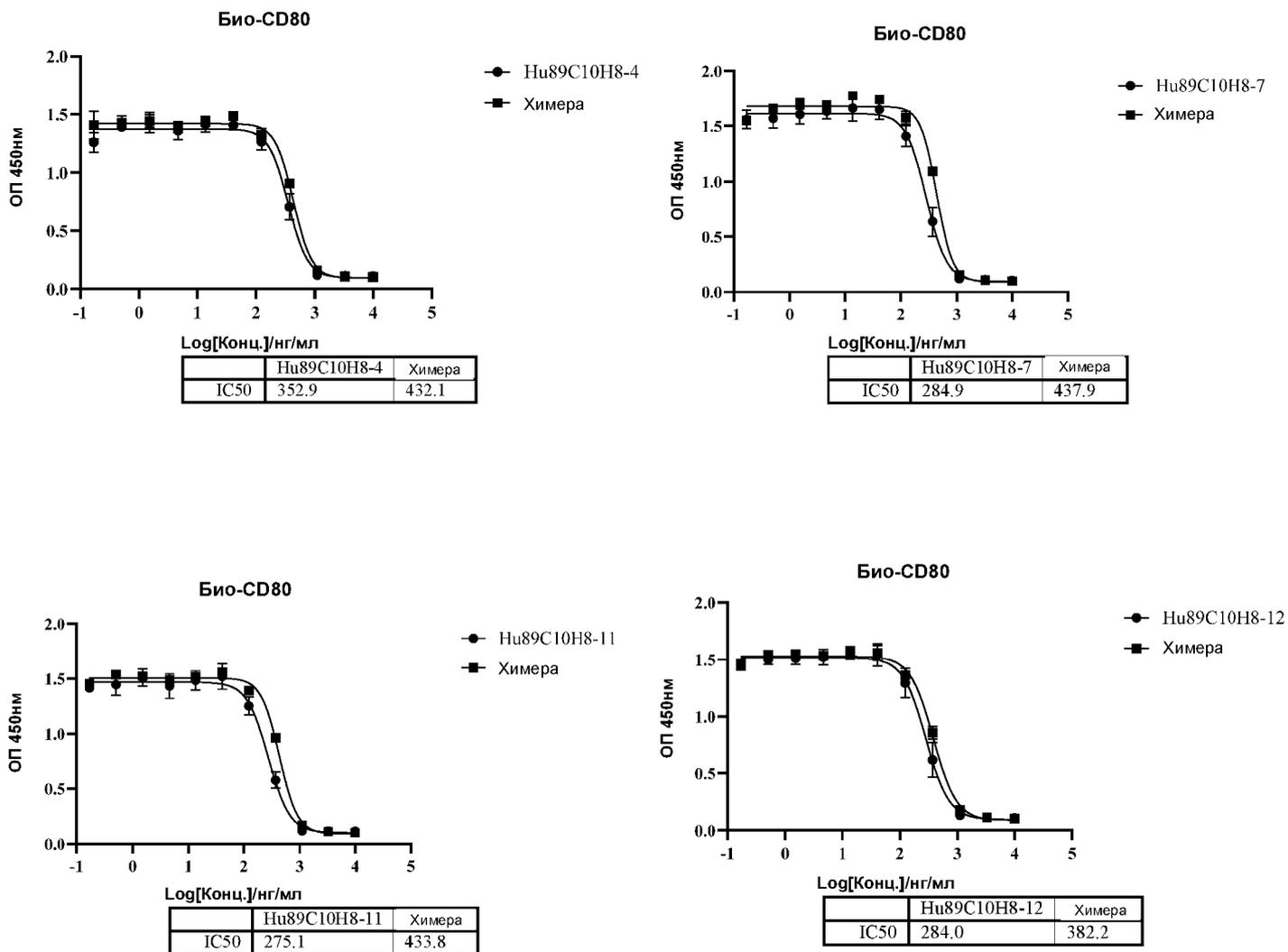
ФИГ. 9А



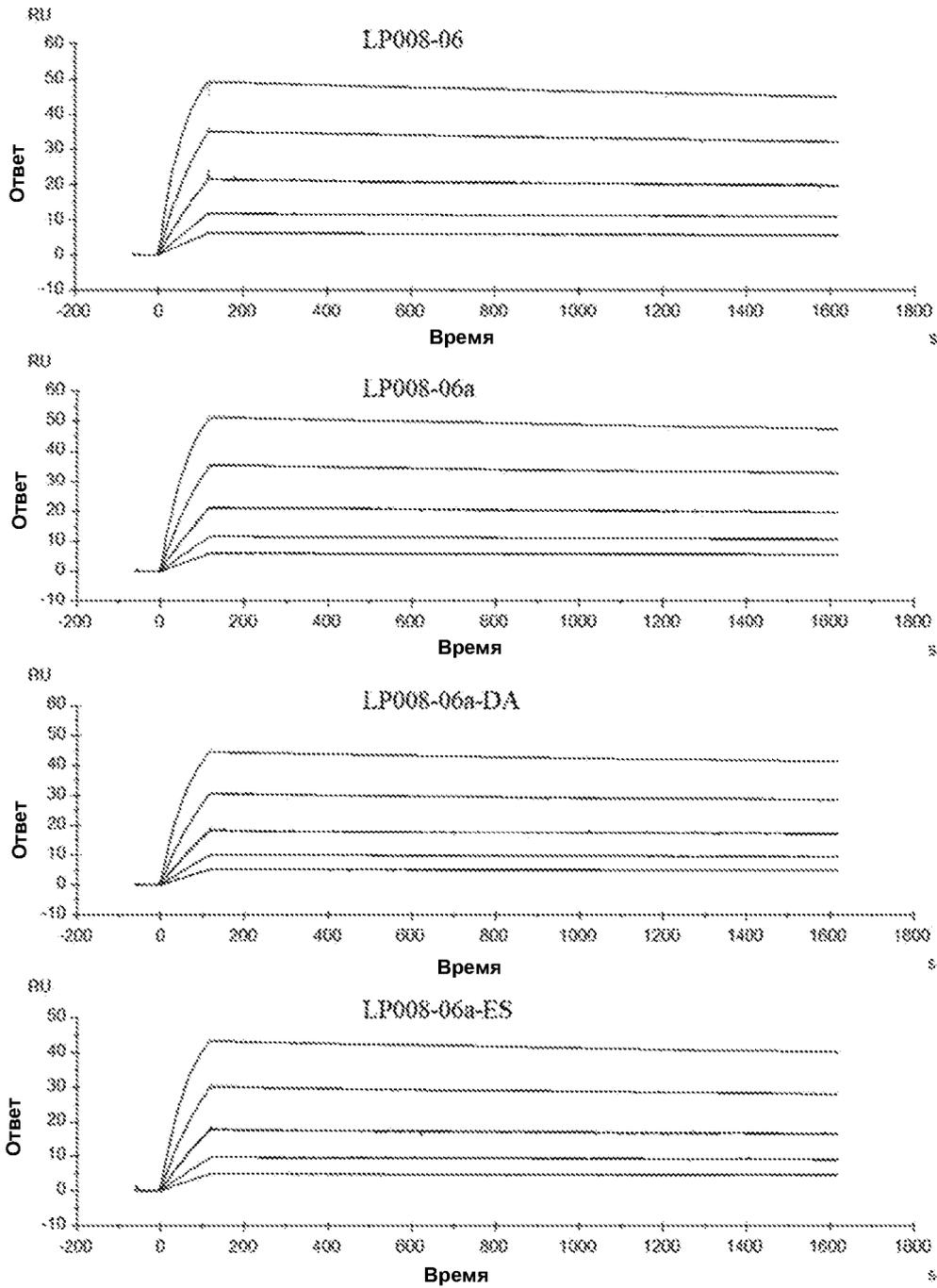
ФИГ. 9В



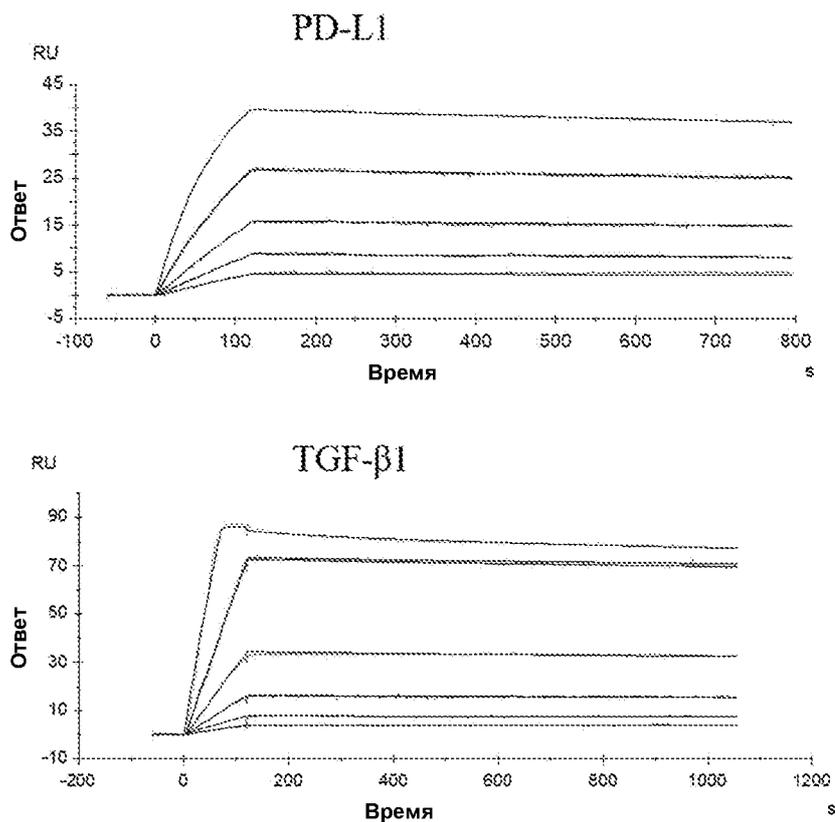
ФИГ. 9В
(продолж.)



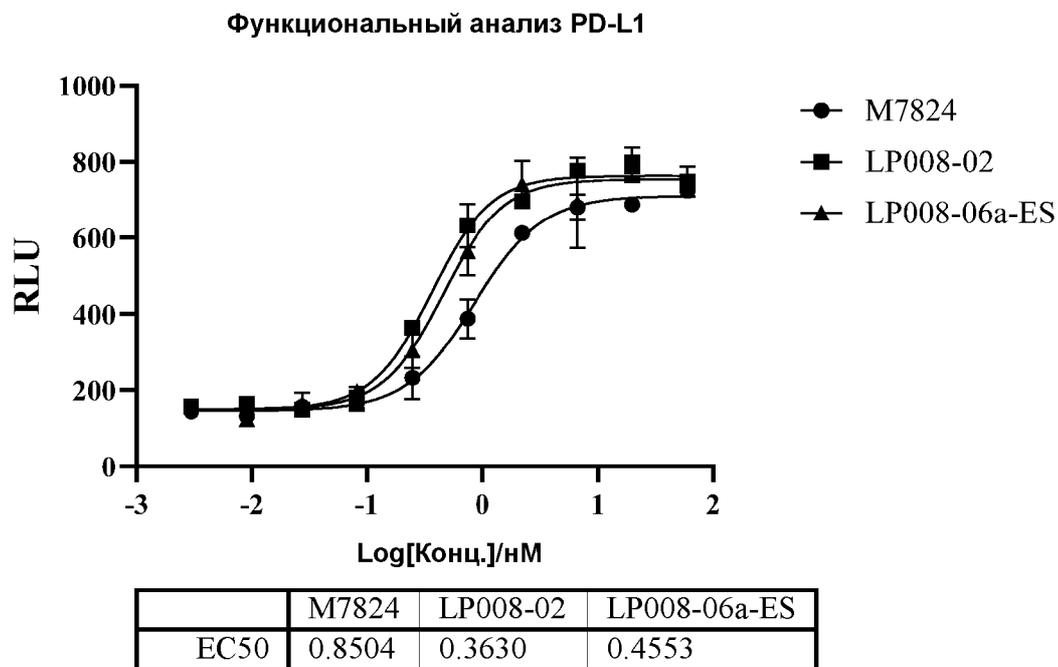
ФИГ. 9С



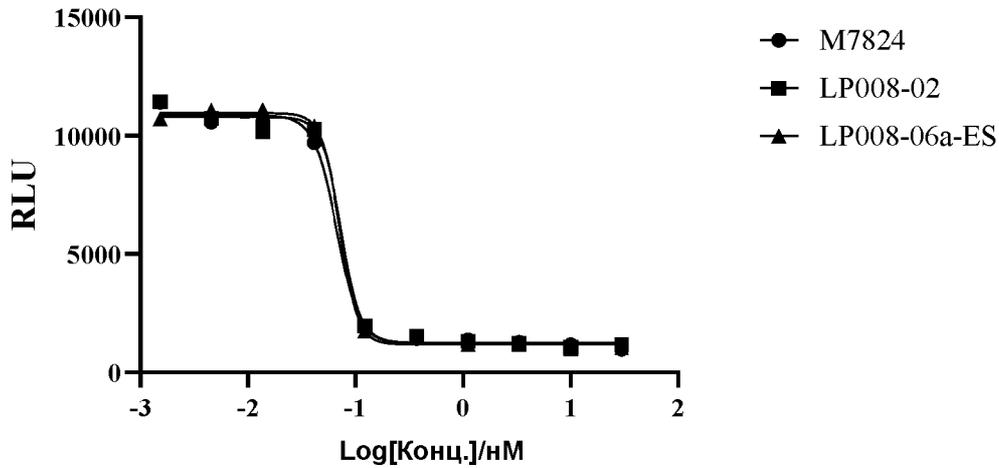
ФИГ. 10



ФИГ. 11



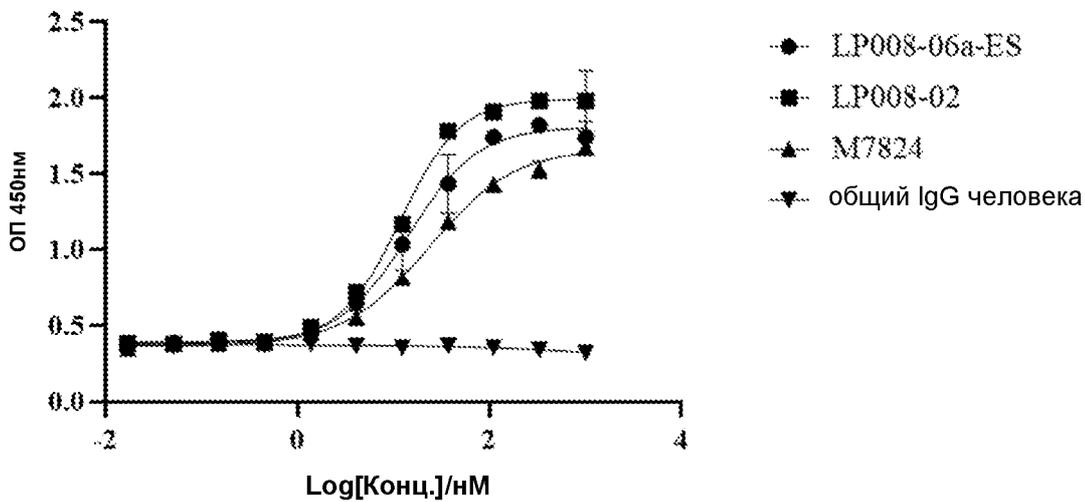
ФИГ. 12

Функциональный анализ TGF- β 

	M7824	LP008-02	LP008-06a-ES
IC50	0.06687	0.07352	0.07167

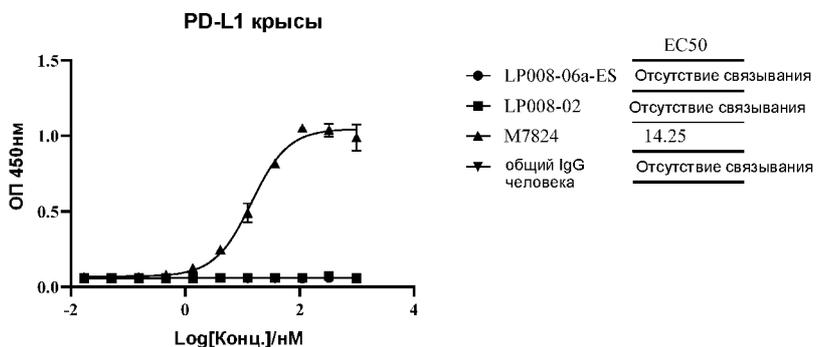
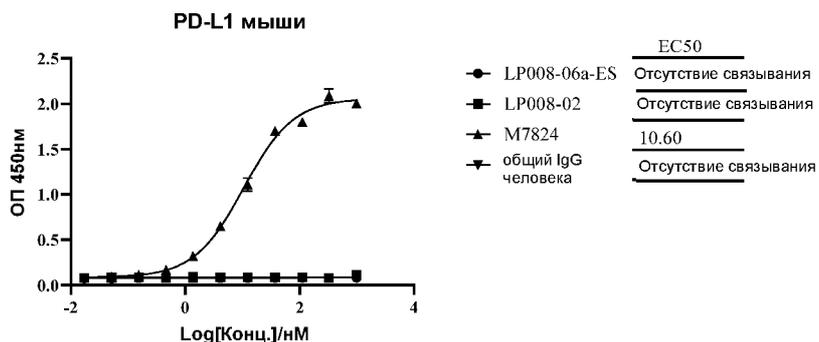
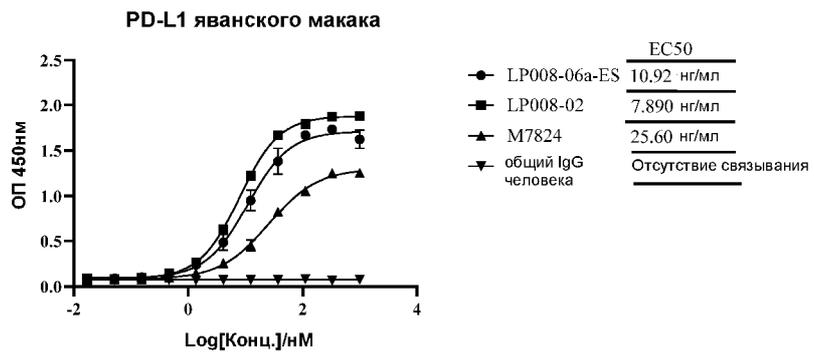
ФИГ. 13

PD-L1 человека

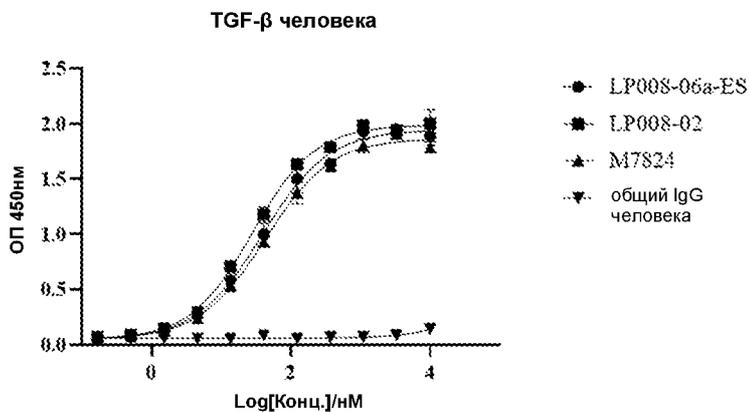


	LP008-06a-ES	LP008-02	M7824
EC50	14.36	11.82	23.68

ФИГ. 14

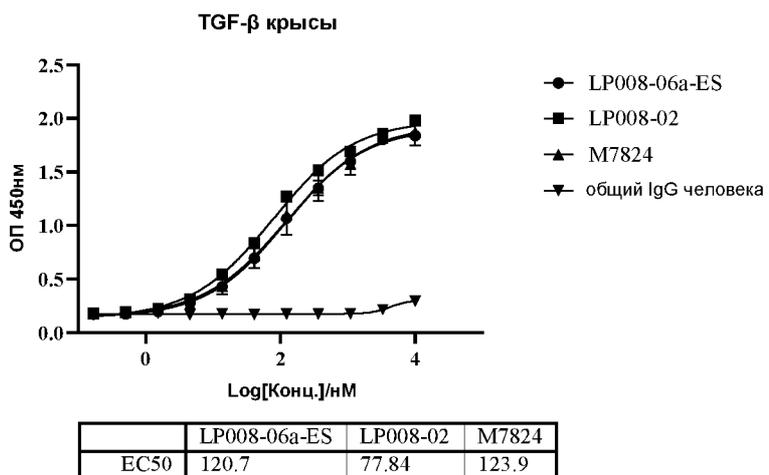
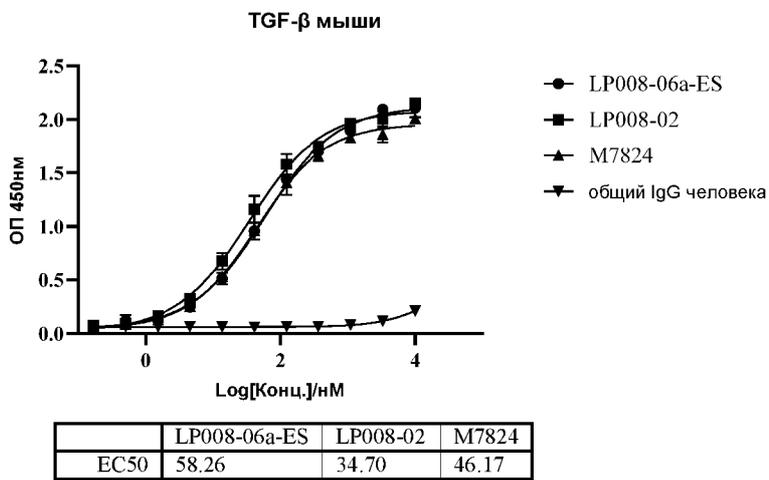
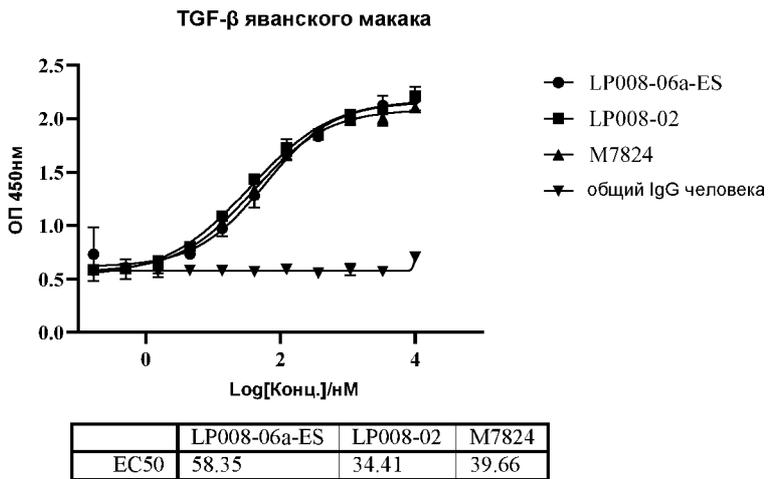


ФИГ. 15

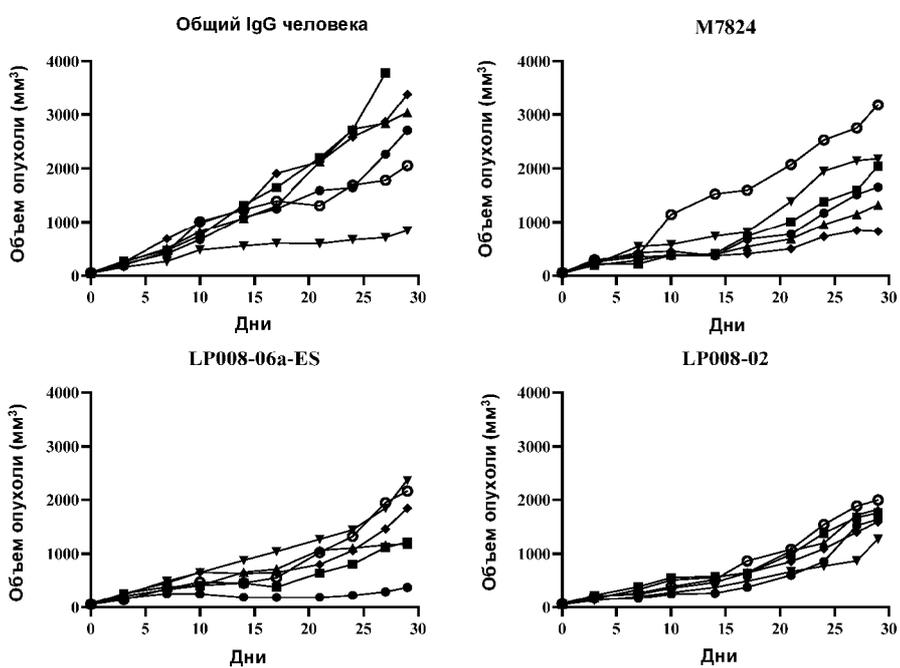
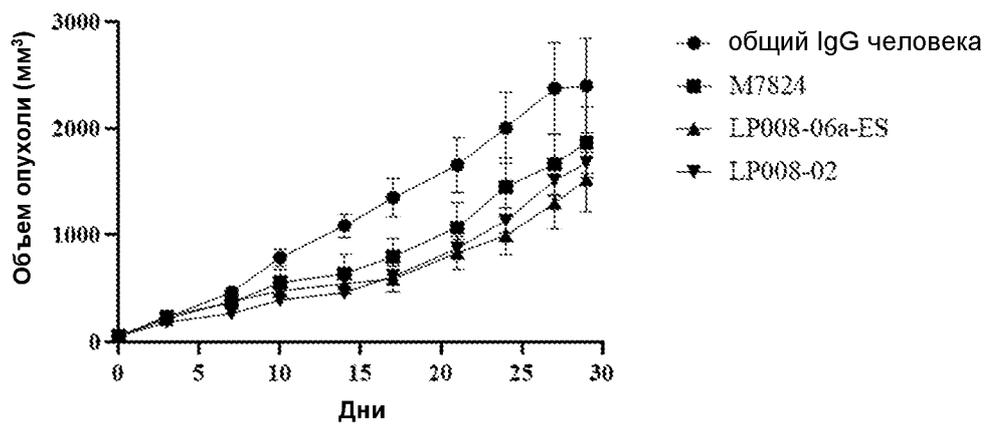


	LP008-06a-ES	LP008-02	M7824
EC50	39.38	28.58	43.43

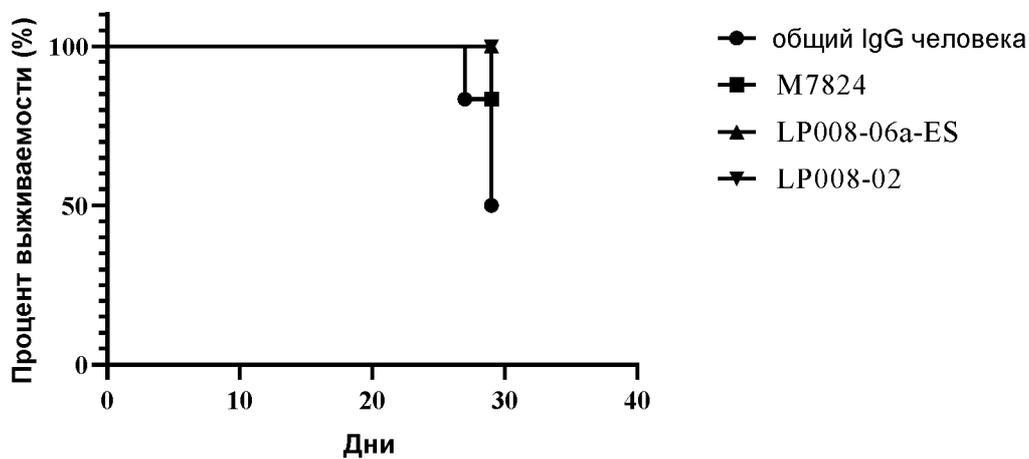
ФИГ. 16



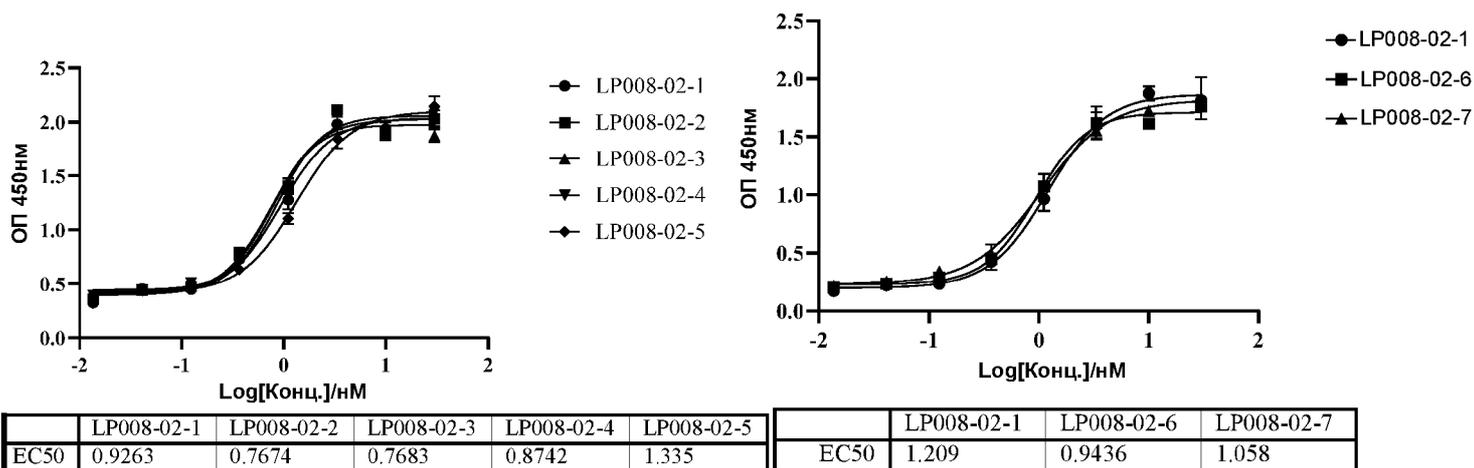
ФИГ. 17



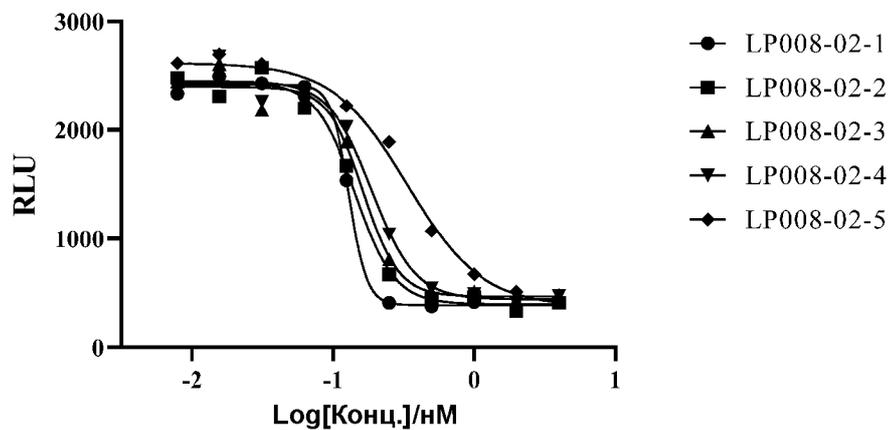
ФИГ. 18А



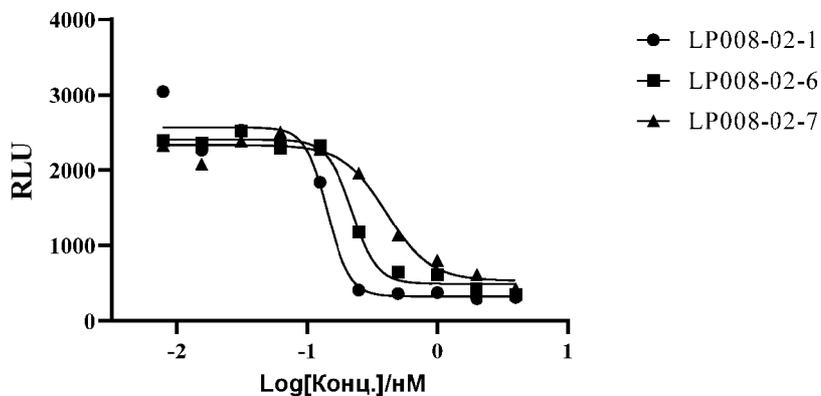
ФИГ. 18В



ФИГ. 19

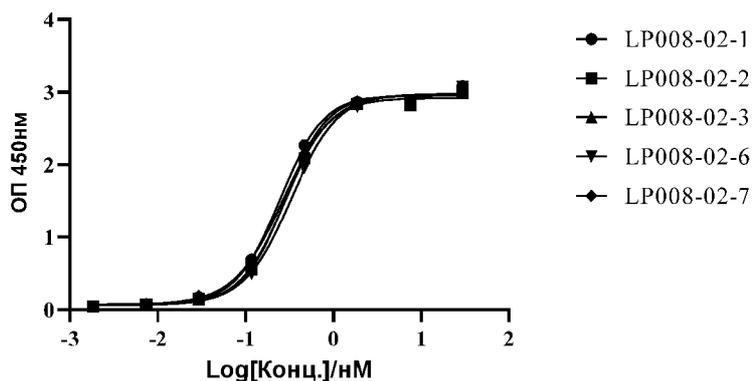


	LP008-02-1	LP008-02-2	LP008-02-3	LP008-02-4	LP008-02-5
IC50	0.1299	0.1435	0.1639	0.1882	0.3363



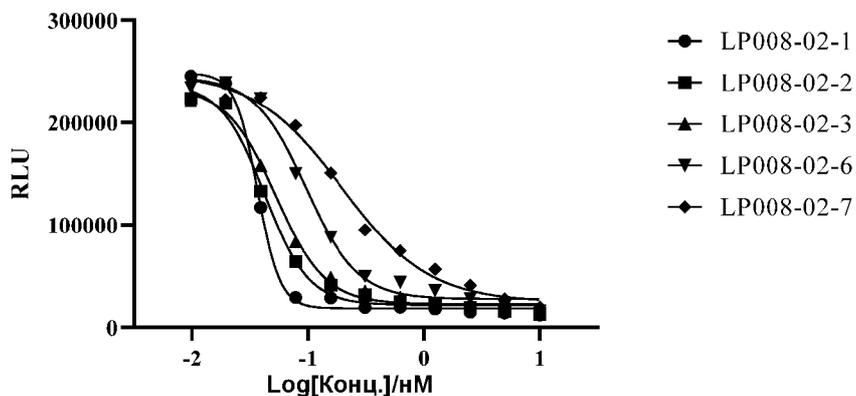
	LP008-02-1	LP008-02-6	LP008-02-7
IC50	0.1434	0.2225	0.4082

ФИГ. 20



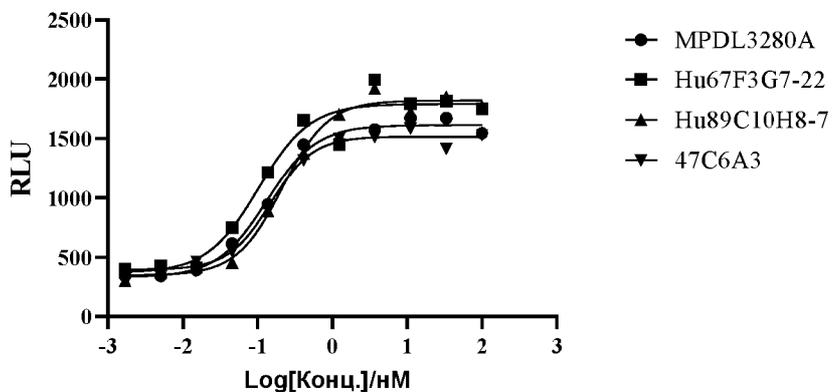
	LP008-02-1	LP008-02-2	LP008-02-3	LP008-02-6	LP008-02-7
EC50	0.2449	0.2782	0.2804	0.3284	0.2673

ФИГ. 21



	LP008-02-1	LP008-02-2	LP008-02-3	LP008-02-6	LP008-02-7
IC50	0.03681	0.04231	0.05270	0.09616	0.1962

ФИГ. 22



	MPDL3280A	Hu67F3G7-22	Hu89C10H8-7	47C6A3
Top	1613	1791	1819	1517
LogEC50	-0.8773	-0.9856	-0.6700	-0.8237
HillSlope	1.316	1.269	1.425	1.545
EC50	0.1327	0.1034	0.2138	0.1501

ФИГ. 23