

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 037855

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2021.05.27

(21) Номер заявки  
201891709

(22) Дата подачи заявки  
2017.01.27

(51) Int. Cl. C12P 21/08 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01)

---

(54) ПОЛНОСТЬЮ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО КЛАССА IGG, СВЯЗЫВАЮЩЕЕСЯ С  
ЭПИТОПОМ PD-L1

---

(31) 62/288,912

(32) 2016.01.29

(33) US

(43) 2019.01.31

(86) PCT/US2017/015429

(87) WO 2017/132562 2017.08.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
СОРРЕНТО ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.  
(US)

(72) Изобретатель:  
Чжоу Хэюэ (US)

(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-20130323249  
US-A1-20150274835

---

(57) Заявлены полностью человеческие антитела класса IgG, которые связываются с эпитопом PD-L1, Fab-фрагмент указанного антитела и одноцепочечное антитело человека к PD-L1 с переменным доменом тяжелой цепи и переменным доменом легкой цепи, связанные пептидным линкером.

---

037855

B1

037855

B1

### Родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет временной патентной заявки США № 62/288912, поданной 29 января 2016 года, полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

### Список последовательностей

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который подан в электронной форме в формате ASCII и, таким образом, полностью включен в качестве ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 30 июля 2018 года, имеет название Списки последовательностей.txt и имеет размер 6161 Б.

### Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к антителам против PD-L1 класса IgG, для которых существует улучшенная возможность производства с высоким выходом. Более конкретно, настоящее изобретение относится к антителам человека, которые связываются с PD-L1, связывающим PD-L1 фрагментам и производным таких антител и к связывающим PD-L1 полипептидам, содержащим такие фрагменты.

### Уровень техники

Лиганд белка программируемой гибели 1 (PD-L1) представляет собой трансмембранный белок 1 типа массой 40 кДа. PD-L1 (кДНК PD-L1 человека состоит из последовательности оснований с номером доступа EMBL/GenBank NM\_001267706, а кДНК PD-L1 мыши состоит из последовательности оснований с номером NM\_021893), который является лигандом PD-1, экспрессирован в так называемых антиген-презентирующих клетках, таких как активированные моноциты и дендритные клетки. Эти клетки презентуют взаимодействующие молекулы, которые запускают ряд иммуноиндуцирующих сигналов Т-лимфоцитам, а PD-L1 представляет собой одну из этих молекул, которая индуцирует ингибирующий сигнал, связываясь с PD-1. Было обнаружено, что связывание PD-L1 подавляет активацию (пролиферацию клеток и индукцию продукции различных цитокинов) Т-лимфоцитов, экспрессирующих PD-1. Экспрессия PD-L1 подтверждена не только в иммунокомпетентных клетках, но также и в линиях опухолевых клеток определенных типов (линии клеток, полученные из клеток моноцитарного лейкоза, линии клеток, полученные из тучных клеток, линии клеток, полученные из клеток печеночной карциномы, линии клеток, полученные из нейробластов, и линии клеток, полученные из карциномы молочной железы) (Nature Immunology (2001), том 2, выпуск 3, стр.261-267).

Белок программируемой гибели 1 (PD-1) является представителем семейства рецепторов CD28, которое включает CD28, CTLA-4, ICOS, PD-L1 и BTLA. Первый представитель семейства, CD28, обнаружен по функциональному действию на усиление пролиферации Т-клеток после добавления моноклональных антител (Hutloff et al. (1999) Nature 397:263-266; Hansen et al. (1980) Immunogenics 10:247-260). На поверхности клеток идентифицированы два гликопротеиновых лиганда PD-1, PD-L1 и PD-L2, и для них показано, что они подавляют активацию Т-клеток, и при связывании с PD-1 происходит секреция цитокинов (Freeman et al. (2000) J. Exp. Med. 192:1027-34; Latchman et al. (2001) Nat. Immunol. 2:261-8; Carter et al. (2002) Eur. J. Immunol. 32:634-43; Ohigashi et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:2947-53). Как PD-L1 (B7-H1), так и PD-L2 (B7-DC) являются гомологами B7, которые связываются с PD-1. Также показано, что экспрессию PD-L1 на поверхности клеток также увеличивает стимуляция IFN-γ.

Экспрессия PD-L1 обнаружена в нескольких злокачественных опухолях мышей и человека, включая карциному легких, яичников и толстой кишки человека и различные миеломы (Iwai et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:12293-7; Ohigashi et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:2947-53). Полагают, что PD-L1 играет роль в противоопухолевом иммунитете, усиливая апоптоз клонов антиген-специфичных Т-клеток (Dong et al. (2002) Nat. Med. 8:793-800). Также полагают, что PD-L1 может участвовать в воспалении слизистой кишечника, и ингибирование PD-L1 тормозит синдром истощения, связанный с колитом (Kanaei et al. (2003) J. Immunol. 171:4156-63).

### Сущность изобретения

По изобретению выявлено, что антитело (обозначенное как H6B1L), описанное в публикации патентной заявки США № 20130323249 (13/907685, подана 31 мая 2013 года) (описание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки) как дикий тип с SEQ ID NO: 213 для тяжелой цепи и SEQ ID NO: 214 для легкой цепи, невозможно производить в достаточном количестве в определенных условиях, учитывая фрагментацию N-конца. Таким образом, настоящее изобретение относится к вариантам антитела H6B1L, которые могут быть получены, в частности в клетках CHO, без фрагментации легкой цепи.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к полностью человеческому антителу класса IgG, которое связывается с эпитопом PD-L1, которое содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и последовательность переменного домена легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3. Предпочтительно, полностью человеческое антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где антитело содержит последовательности переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 (в настоящем описании обозначено как H6B1L-EM) и SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 3 (в настоящем описании обозначено как H6B1L-EV).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фрагменту Fab полностью человеческого антитела, который содержит область переменного домена тяжелой цепи и область переменного домена легкой цепи, где последовательность переменного домена тяжелой цепи по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и фрагмент содержит последовательность переменного домена легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3. Предпочтительно, фрагмент Fab полностью человеческого антитела содержит область переменного домена тяжелой цепи и область переменного домена легкой цепи, где антитело содержит последовательности переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 3.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к одноцепочечному антителу человека, которое содержит область переменного домена тяжелой цепи и область переменного домена легкой цепи и пептидную линкерную связь, соединяющую области переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи, где последовательность переменного домена тяжелой цепи по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и антитело содержит последовательность переменного домена легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3. Предпочтительно, полностью человеческое одноцепочечное антитело содержит и область переменного домена тяжелой цепи и область переменного домена легкой цепи, где полностью человеческое одноцепочечное антитело содержит последовательности переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 3.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение также относится к способу лечения широкого спектра злокачественных опухолей млекопитающих или широкого спектра воспалительных заболеваний и аутоиммунных заболеваний, включающему введение эффективного количества полипептида против PD-L1, где полипептид против PD-L1 выбран из группы, состоящей из полностью человеческого антитела класса IgG, которое связывается с эпитопом PD-L1, фрагмента Fab полностью человеческого антитела, содержащего область переменного домена тяжелой цепи и область переменного домена легкой цепи, одноцепочечного человеческого антитела, содержащего область переменного домена тяжелой цепи и область переменного домена легкой цепи и пептидную линкерную связь областей переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи, а также их комбинации, где полностью человеческое антитело содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и антитело содержит последовательность переменного домена легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; где фрагмент Fab полностью человеческого антитела содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и фрагмент содержит последовательность переменного домена легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; и где одноцепочечное антитело человека содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и антитело содержит последовательность переменного домена легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит домен CDR1, домен CDR2 и домен CDR3, как они показаны в аминокислотных последовательностях SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления полностью человеческое антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где антитело содержит последовательности переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 (в настоящем описании обозначено как H6B1L-EM) и SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 3 (в настоящем описании обозначено как H6B1L-EV). Предпочтительно, фрагмент Fab полностью человеческого антитела содержит область переменного домена тяжелой цепи и область переменного домена легкой цепи, где антитело содержит последовательности переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 (в настоящем описании обозначено как H6B1L-EM) и SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 3 (в настоящем описании обозначено как H6B1L-EV). Предпочтительно полностью человеческое одноцепочечное антитело содержит область переменного домена тяжелой цепи и область переменного домена легкой цепи, где полностью человеческое одноцепочечное антитело содержит последовательности переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 3.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к полностью человеческому антителу класса IgG, которое связывается с эпитопом PD-L1, где антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, и содержит переменный домен

легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, как они показаны в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

В других вариантах осуществления изобретение относится к полностью человеческому антителу класса IgG, которое связывается с эпитопом PD-L1, где антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий домен CDR1, домен CDR2 и домен CDR3, как приведено в аминокислотных последовательностях SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7 соответственно, и содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, как приведено в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полностью человеческое антитело по изобретению может представлять собой IgG1 или IgG4.

В одном из вариантов осуществления изобретения также относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело против PD-L1 (или его фрагмент) по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Также изобретение относится к способу лечения человека, страдающего злокачественной опухолью или аутоиммунным или воспалительным заболеванием, где указанный способ включает введение эффективного количества полностью человеческого антитела, фрагмента Fab или scFv к PD-L1. В одном из вариантов осуществления широкий спектр подлежащих лечению злокачественных опухолей млекопитающих выбран из группы, состоящей из рака яичника, толстой кишки, молочной железы, легких, миеломы, опухолей ЦНС нейробластного происхождения, моноцитарных лейкозов, В-клеточных лейкозов, Т-клеточных лейкозов, В-клеточных лимфом, Т-клеточных лимфом, опухолей из тучных клеток и их сочетаний. В одном из вариантов осуществления аутоиммунное заболевание или воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из воспаления слизистой кишечника, синдрома изнурения, связанного с колитом, рассеянного склероза, системной красной волчанки, вирусных инфекций, ревматоидного артрита, остеоартрита, псориаза, болезни Крона и воспалительного заболевания кишечника. В одном из вариантов осуществления антитело или фрагмент по изобретению получают в клетке-хозяине млекопитающего, например клетке яичника китайского хомяка (CHO).

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1А и 1В представлено сравнение масс-спектрометрических пиков легких цепей исходного антитела H6B1L дикого типа на верхнем графике (фиг. 1А) и варианта антитела H6-B1L-EM по изобретению на нижнем графике (фиг. 1В). Как представлено на фиг. 1В, у легкой цепи H6B1LEM по сравнению с исходной легкой цепью фрагментов легкой цепи (LC) не выявляли. Антитела, представленные на фиг. 1, получали в клетках CHO.

#### Подробное описание

##### Определения.

"Антигенсвязывающий белок" представляет собой белок, содержащий часть, которая связывается с антигеном, и, необязательно, поддерживающую или каркасную часть, которая позволяет антигенсвязывающей части принимать конформацию, которая обеспечивает связывание антигенсвязывающего белка с антигеном. Примеры антигенсвязывающих белков включают антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающая часть антитела), производные антител и аналоги антител. Антигенсвязывающий белок может содержать, например, альтернативный каркас белка или искусственный каркас с привитыми CDR или производными CDR. Такие каркасы включают, но не ограничиваются ими, получаемые из антител каркасы, содержащие мутации, вводимые, например, для стабилизации трехмерной структуры антигенсвязывающего белка, а также полностью синтетические каркасы, содержащие, например, биосовместимый полимер. См., например, Korndorfer et al., 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, том 53, выпуск 1:121-129; Roque et al., 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654. Кроме того, могут быть использованы пептидомиметики антител ("PAM"), а также каркасы на основе миметиков антител, используя в качестве каркаса компоненты фибронектина.

Антигенсвязывающий белок может иметь структуру, например, природного иммуноглобулина. "Иммуноглобулин" представляет собой тетрамерную молекулу. В "интактном иммуноглобулине" (который содержит структуры тяжелой и легкой цепей, такие как в природном иммуноглобулине) каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, где каждая пара содержит одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). N-концевая часть каждой цепи содержит переменную область размером приблизительно от 100 до 110 или более аминокислот, преимущественно обеспечивающую распознавание антигена. С-концевая часть каждой цепи определяет константную область, преимущественно обеспечивающую эффекторную функцию. Легкие цепи человека классифицируют как легкие цепи  $\kappa$  или  $\lambda$ . Тяжелые цепи классифицируют как цепи  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  или  $\epsilon$ , которые определяют изотипы антител IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. В легких и тяжелых цепях переменные и константные области связаны посредством области "J" длиной приблизительно 12 или более аминокислот, где тяжелая цепь также содержит область "D" длиной приблизительно 10 или более аминокислот. В основном см. *Fundamental Immunology*, гл. 7 (Paul W., ред., 2-е изд. Raven Press, N.Y. (1989)) (полностью включенной в качестве ссылки в полном объеме). Переменные области

каждой пары легких/тяжелых цепей образуют участок связывания антитела так, что интактный иммуноглобулин содержит два участка связывания. Следует отметить, что термин "природный иммуноглобулин" относится не к источнику иммуноглобулина, а скорее к общей структуре иммуноглобулина.

Вариабельные области цепей природных иммуноглобулинов демонстрируют сходную общую структуру их относительно консервативных каркасных областей (FR), связанных тремя гипервариабельными областями, также называемыми определяющими комплементарность областями или CDR. В направлении от N-конца к С-концу легкие и тяжелые цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Аминокислоты соотносят с каждым из доменов в соответствии с определениями Kabat et al. в *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, публикация NIH № 91-3242, 1991. Другие системы нумерации аминокислот в цепях иммуноглобулинов включают IMGT.RTM. (международная информационная система ImMunoGeneTics; Lefranc et al., *Dev. Comp. Immunol.* 29:185-203; 2005) и AHO (Honegger and Pluckthun, *J. Mol. Biol.* 309 (3):657-670; 2001).

Антитела могут быть получены из таких источников, как сыворотка или плазма, которые содержат иммуноглобулины с различной антигенной специфичностью. Если такие антитела подвергать аффинной очистке, то они могут обогатить по конкретной антигенной специфичности. Как правило, такие обогащенные препараты антител содержат менее чем приблизительно 10% антитела с активностью специфического связывания с конкретным антигеном. Подвергая эти препараты нескольким циклам аффинной очистки, можно повысить долю антитела с активностью специфического связывания с антигеном. Получаемые таким образом антитела часто обозначают как "моноспецифические". Препараты моноспецифических антител могут содержать приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 99,9% антитела с активностью специфического связывания с конкретным антигеном.

"Антитело" относится к интактному иммуноглобулину или его антигенсвязывающей части, которая конкурирует с интактным антителом за специфическое связывание, если не указано иное. В одном из вариантов осуществления антитело представляет собой интактный иммуноглобулин. Антигенсвязывающие части могут быть получены способами рекомбинантных ДНК или посредством ферментативного или химического расщепления интактных антител. Антигенсвязывающие части в числе прочих включают Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, доменные антитела (dAb) и фрагменты определяющих комплементарность областей (CDR), одноцепочечные антитела (scFv), химерные антитела, диатела, триотела, тетратела и полипептиды, которые содержат по меньшей мере часть иммуноглобулина, достаточную для обеспечения специфического связывания антигена полипептидом.

Определяющие комплементарность области (CDR) и каркасные области (FR) конкретного антитела могут быть идентифицированы с использованием системы, описанной в Kabat et al., выше; Lefranc et al., выше и/или Honegger and Pluckthun, выше. В молекулу могут быть ковалентно или нековалентно встроены одна или несколько CDR с получением антигенсвязывающего белка. CDR в антигенсвязывающем белке может содержаться в виде части более длинной полипептидной цепи, CDR в нем может ковалентно связываться с другой полипептидной цепью, или CDR может быть встроена в него нековалентным способом. CDR обеспечивают специфическое связывание антигенсвязывающего белка с конкретным антигеном, представляющим интерес.

Антигенсвязывающий белок может содержать один или несколько участков связывания. Если присутствует более одного участка связывания, участки связывания могут быть идентичны друг другу или могут различаться. Например, как правило, природный иммуноглобулин человека содержит два идентичных участка связывания, тогда как "биспецифическое" или "бифункциональное" антитело содержит два различных участка связывания.

Термин "антитело человека" включает антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которое содержит одну или несколько вариабельных и константных областей, получаемых из последовательностей иммуноглобулинов человека. В одном из вариантов осуществления все вариабельные и константные домены получают из последовательностей иммуноглобулинов человека (полностью человеческое антитело). Эти антитела могут быть получены рядом способов, примеры которых описаны ниже, включая иммунизацию представляющим интерес антигеном мышей, генетически модифицированных и экспрессирующих антитела, получаемые на основе генов, кодирующих тяжелые и/или легкие цепи человека. Антитела человека можно идентифицировать рядом способов, включая фаговый дисплей или иммунизацию мышей представляющим интерес антигеном, где мыши генетически модифицированы и экспрессируют антитела, получаемые на основе генов, кодирующих тяжелые и/или легкие цепи человека. В одном из вариантов осуществления полностью человеческое антитело получают рекомбинантными способами так, что профиль гликозилирования антитела отличался от антитела с той же последовательностью, если она вообще существует в природе.

"Гуманизированное антитело" содержит последовательность, которая отличается от последовательности антитела, полученного у не являющихся человеком видов, одной или несколькими заменами, deletions и/или добавлениями аминокислот так, что гуманизированное антитело с меньшей вероятностью индуцирует иммунный ответ и/или индуцирует менее сильный иммунный ответ по сравнению с ответом, индуцируемым антителом не являющегося человеком вида при его введении человеку. В одном из вари-

антов осуществления определенные аминокислоты в каркасных и константных доменах тяжелой и/или легкой цепей антитела не являющегося человеком вида подвергают мутированию с получением гуманизированного антитела. В другом варианте осуществления константный домен(ы) антитела человека гибридизируют с переменным доменом(ами) не являющихся человеком видов. В другом варианте осуществления для снижения возможной иммуногенности не принадлежащего человеку антитела при его введении человеку проводят замену одного или нескольких аминокислотных остатков в одной или нескольких последовательностях CDR не принадлежащего человеку антитела, где заменяемые аминокислотные остатки не являются существенно важными для иммуноспецифического связывания антитела с его антигеном или проводимые в аминокислотной последовательности замены являются консервативными заменами так, что связывание гуманизированного антитела с антигеном не является значимо худшим, чем связывания не принадлежащего человеку антитела с антигеном. Примеры получения гуманизированных антител можно найти в патентах США 6054297, 5886152 и 5877293.

Термин "химерное антитело" относится к антителу, которое содержит одну или несколько областей из одного антитела и одну или несколько областей одного или нескольких других антител. В одном из вариантов осуществления один или несколько CDR получают из антитела против PD-L1 человека. В другом варианте осуществления из антитела против PD-L1 человека получают все CDR. В другом варианте осуществления в химерном антителе смешивают и сочетают CDR более одного антитела против PD-L1 человека. Например, химерное антитело может содержать CDR1 легкой цепи первого антитела против PD-L1 человека, CDR2 и CDR3 легкой цепи второго антитела против PD-L1 человека и CDR тяжелой цепи третьего антитела против PD-L1. Возможны другие комбинации. Кроме того, каркасные области могут быть получены из одного из одинаковых антител против PD-L1, из одного или нескольких различных антител, таких как антитело человека, или из гуманизированного антитела. В одном из примеров химерного антитела часть тяжелой и/или легкой цепи идентична, гомологична или получена из антитела конкретного вида или относится к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи(ей) идентична, гомологична или получена из антитела(антител) других видов или относится к другому классу или подклассу антител. Также включены фрагменты таких антител, которые демонстрируют требуемую биологическую активность (т.е. способность специфически связываться с PD-L1).

"Фрагмент Fab" представляет собой одновалентный фрагмент, содержащий домены  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  и  $C_{H1}$ ; фрагмент  $F(ab)_2$  представляет собой двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области; фрагмент Fd содержит домены  $V_H$  и  $C_{H1}$ ; фрагмент Fv содержит домены  $V_L$  и  $V_H$  одного плеча антитела; и фрагмент dAb содержит домен  $V_H$ , домен  $V_L$  или антигенсвязывающий фрагмент домена  $V_H$  или  $V_L$  (патенты США 6846634; 6696245, публикации заявок США 20/0202512; 2004/0202995; 2004/0038291; 2004/0009507; 2003/0039958 и Ward et al., Nature 341:544-546, 1989).

"Одноцепочечное антитело" или "scFv" представляет собой антитело, в котором области  $V_L$  и  $V_H$  связаны линкером (например, синтетической последовательностью аминокислотных остатков) с образованием непрерывной белковой цепи. В некоторых вариантах осуществления линкер обладает достаточной длиной для того, чтобы обеспечить обратную укладку белковой цепи на саму себя и образовать одновалентный антигенсвязывающий участок (см., например, Bird et al., 1988, Science 242:423-26 и Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83). Диатела представляют собой двухвалентные антитела, содержащие две полипептидные цепи, в которых каждая полипептидная цепь содержит домены  $V_H$  и  $V_L$ , связанные линкером, который является достаточно коротким для того, чтобы обеспечить спаривание двух доменов одной и той же цепи, таким образом, обеспечивая спаривание каждого домена с комплементарным доменом другой полипептидной цепи (см., например, Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, и Poljak et al., 1994, Structure 2:1121-23). Если две полипептидные цепи диатела идентичны, то диатело, образующееся в результате спаривания, содержит два идентичных антигенсвязывающих участка. Полипептидные цепи с различными последовательностями можно использовать для получения диатела с двумя различными антигенсвязывающими участками. Подобным образом, триотела и тетратела представляют собой антитела, содержащие три и четыре полипептидные цепи, соответственно, и формирующие три и четыре антигенсвязывающих участка, соответственно, которые могут являться одинаковыми или различными.

"Нейтрализующее антитело" или "ингибирующее антитело" представляет собой антитело, которое ингибирует протеолитическую активацию PD-L1, когда избыток антитела к PD-L1 при использовании такого анализа, как анализ, описываемый в примерах настоящего описания, снижает степень активации по меньшей мере приблизительно на 20%. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок снижает степень протеолитической активации PD-L1 по меньшей мере на 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 и 99,9%.

Фрагменты или аналоги антител могут быть легко получены специалистами в данной области на основании настоящего описания и известными в данной области способами. Предпочтительные N- и C-концы фрагментов или аналогов находятся рядом с границами функциональных доменов. Структурные и функциональные домены могут быть идентифицированы посредством сравнения данных о нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности с общедоступными или частными базами данных последова-

тельностью. Для идентификации мотивов последовательностей или теоретически рассчитанных конформационных доменов белка, которые встречаются в других белках известной структуры и/или функции, могут быть использованы компьютеризированные способы сравнения. Способы идентификации последовательностей белков, которые укладываются в известную трехмерную структуру, известны. См., Bowie et al., 1991, Science 253:164.

"Антитело с привитыми CDR" представляет собой антитело, которое содержит одну или несколько CDR, полученные из антитела конкретного вида или изотипа, и каркас другого антитела того же или другого вида или изотипа.

"Полиспецифическое антитело" представляет собой антитело, которое распознает более одного эпитопа на одном или нескольких антигенах. Подклассом антител этого типа является "биспецифическое антитело", которое распознает два различных эпитопа на одном или различных антигенах.

Антигенсвязывающий белок "специфически связывается" с антигеном (например, PD-L1 человека), если он связывается с антигеном с константой диссоциации 1 наномоль или менее.

"Антигенсвязывающий домен", "антигенсвязывающая область" или "антигенсвязывающий участок" представляют собой часть антигенсвязывающего белка, которая содержит аминокислотные остатки (или другие фрагменты), которые взаимодействуют с антигеном и вносят вклад в специфичность и аффинность антигенсвязывающего белка в отношении антигена. У антитела, которое специфически связывается со своим антигеном, эта часть содержит по меньшей мере часть по меньшей мере одного из его доменов CDR.

"Эпитоп" представляет собой часть молекулы, которую связывает антигенсвязывающий белок (например, антитело). Эпитоп может содержать не прилегающие части молекулы (например, в полипептиде, аминокислотные остатки, которые не являются последовательными в первичной последовательности полипептида, но которые в условиях третичной и четвертичной структур полипептида находятся достаточно близко друг к другу, чтобы их связывал антигенсвязывающий белок).

"Процент идентичности" или "процент гомологии" двух полинуклеотидных или двух полипептидных последовательностей определяют посредством сравнения последовательностей с использованием компьютерной программы GAP (часть пакета GCG Wisconsin Package, версии 10.3 (Accelrys, San Diego, Calif.)) и ее параметров по умолчанию.

Термины "полинуклеотид", "олигонуклеотид" и "нуклеиновая кислота" на протяжении всего описания используют взаимозаменяемо, и они включают молекулы ДНК (например, кДНК или геномной ДНК), молекулы РНК (например, мРНК), аналоги ДНК или РНК, получаемые с использованием аналогов нуклеотидов (например, пептидные нуклеиновые кислоты и не встречаемые в природе аналоги нуклеотидов) и их гибриды. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной. В одном из вариантов осуществления молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению содержат непрерывную открытую рамку считывания, кодирующую антитело или его фрагмент, производное, мутант или вариант.

Два одноцепочечных полинуклеотида являются "комплементарными" друг друга, если их последовательности могут быть выровнены в антипараллельной ориентации так, что каждый нуклеотид в одном полинуклеотиде находится напротив комплементарного ему нуклеотида в другом полинуклеотиде, без внесения пропусков и без неспаренных нуклеотидов на 5'- или 3'-конце любой из последовательностей. Полинуклеотид "комплементарен" другому полинуклеотиду, если два полинуклеотида могут гибридизоваться друг с другом при умеренно жестких условиях. Таким образом, полинуклеотид может быть комплементарен другому полинуклеотиду, не являясь его комплементом.

"Вектор" представляет собой нуклеиновую кислоту, которую можно использовать для внесения связанной с ним другой нуклеиновой кислоты в клетку. Одним из типов векторов является "плазмида", которая относится к линейной или кольцевой двухцепочечной молекуле ДНК, в которую можно лигировать дополнительные участки нуклеиновых кислот. Другим типом векторов является вирусный вектор (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), где в вирусный геном можно вводить дополнительные участки ДНК. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, содержащие бактериальный участок начала репликации, и эпизомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэпизомные векторы млекопитающих) при введении в клетку-хозяина встраиваются в геном клетки-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. "Экспрессирующий вектор" представляет собой тип вектора, который может регулировать экспрессию выбранного полинуклеотида.

Нуклеотидная последовательность "функционально связана" с регуляторной последовательностью, если регуляторная последовательность влияет на экспрессию (например, уровень, время или место экспрессии) нуклеотидной последовательности. "Регуляторная последовательность" представляет собой нуклеиновую кислоту, которая влияет на экспрессию (например, уровень, время или место экспрессии) нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана. Например, регуляторная последовательность может действовать на регулируемую нуклеиновую кислоту непосредственно или посредством действия одной или нескольких других молекул (например, полипептидов, которые связываются с регуля-

торной последовательностью и/или нуклеиновой кислотой). Примеры регуляторных последовательностей включают промоторы, энхансеры и другие контролирующие экспрессию элементы (например, сигналы полиаденилирования). Дополнительные примеры регуляторных последовательностей описаны, например, в Goeddel, 1990, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif, и Baron et al., 1995, *Nucleic Acids Res.* 23:3605-06.

"Клетка-хозяин" представляет собой клетку, которую можно использовать для экспрессии нуклеиновой кислоты, например нуклеиновой кислоты по изобретению. Клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку, например *E. coli*, или может представлять собой эукариотическую клетку, например одноклеточного эукариота (например, дрожжи или другой гриб), клетку растения (например, клетку растения табака или томата), клетку животного (например, клетку человека, клетку обезьяны, клетку хомяка, клетку крысы, клетку мыши или клетку насекомого) или гибрид. Примеры клеток-хозяев включают линию клеток почки обезьяны COS-7 (ATCC CRL 1651) (см. Gluzman et al., 1981, *Cell* 23:175), клетки L, клетки C127, клетки 3T3 (ATCC CCL 163), клетки яичника китайского хомяка (CHO) или их производные, такие как Veggie CHO и родственные линии клеток, которые растут в средах без сыворотки (см. Rasmussen et al., 1998, *Cytotechnology* 28:31) или штамм CHO DX-B11 с дефицитом DHFR (см. Urlaub et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-20), клетки HeLa, линии клеток BHK (ATCC CRL 10), линию клеток CV1/EBNA, полученную из линии клеток почки африканской зеленой марьяшки CV1 (ATCC CCL 70) (см. McMahan et al., 1991, *EMBO J.* 10:2821), клетки эмбриональной почки человека, такие как 293, 293 EBNA или MSR 293, эпидермальные клетки человека A431, клетки человека Colo205, другие линии трансформированных клеток приматов, нормальные диплоидные клетки, клеточные линии, получаемые из культуры первичной ткани *in vitro*, первичные эксплантаты, клетки HL-60, U937, HaK или Jurkat. В одном из вариантов осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина млекопитающего, которое не является человеком. Как правило, клетка-хозяин представляет собой культивируемую клетку, которую можно трансформировать или трансфицировать кодирующей полипептид нуклеиновой кислотой, которую затем можно экспрессировать в клетке-хозяине. Фразу "рекомбинантная клетка-хозяин" можно использовать для обозначения клетки-хозяина, трансформированной или трансфицированной нуклеиновой кислотой, подлежащей экспрессии. Клетка-хозяин также может являться клеткой, содержащей нуклеиновую кислоту, но не экспрессирующую ее на требуемом уровне до введения в клетку-хозяина регуляторной последовательности так, что она становится функционально связанной с нуклеиновой кислотой. Следует понимать, что термин клетка-хозяин относится не только к конкретной рассматриваемой клетке, но также и к потомству или возможному потомству такой клетки. Так как в последующих поколениях могут происходить определенные модификации, например вследствие мутации или воздействия окружающей среды, такое потомство, фактически, может являться неидентичным родительской клетке, но все еще входит в объем термина, как его используют в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку CHO.

Термин "рекомбинантное антитело" относится к антителу, экспрессируемому в клетке-хозяине (или в линии клеток), трансфицированной экспрессирующим вектором (или возможно более чем одним экспрессирующим вектором), содержащим кодирующую последовательность антитела или его части (например, последовательность ДНК, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи или легкой цепи, как описано в настоящем документе). В одном из вариантов осуществления указанная кодирующая последовательность не связана с клеткой в природе. В одном из вариантов осуществления профиль гликозилирования рекомбинантного антитела отличается от профиля гликозилирования антитела с той же последовательностью, если таковая вообще существует в природе. В одном из вариантов осуществления рекомбинантное антитело экспрессируют в клетке-хозяине млекопитающего, которая не является клеткой-хозяином человека. Следует отметить, что конкретные клетки-хозяева млекопитающих обеспечивают уникальные профили гликозилирования.

Термины "ингибитор PD-L1" и "антагонист PD-L1" используют взаимозаменяемо. Каждый представляет собой молекулу, которая ингибирует по меньшей мере одну функцию PD-L1, и этот факт можно обнаружить. И наоборот, "агонист PD-L1" представляет собой молекулу, которая усиливает по меньшей мере одну функцию PD-L1 и этот факт можно обнаружить. Необходимости в том, чтобы ингибирование, обуславливаемое ингибитором PD-L1, было полным, при условии, что оно поддается детекции с использованием анализа, нет. Использовать можно любой из анализов функций PD-L1, примеры которых приведены в настоящем описании. Примеры функций PD-L1, которые можно ингибировать ингибитором PD-L1 или усиливать агонистом PD-L1, включают рост или апоптоз (программируемая гибель клеток) злокачественных клеток и так далее. Примеры типов ингибиторов PD-L1 и агонистов PD-L1 включают, но не ограничиваются ими, связывающие PD-L1 полипептиды, такие как антигенсвязывающие белки (например, ингибирующие PD-L1 антигенсвязывающие белки), антитела, фрагменты антител и производные антител.

Каждый из терминов "пептид", "полипептид" и "белок" относится к молекуле, содержащей два или более аминокислотных остатка, связанных друг с другом пептидными связями. Эти термины включают, например, природные и искусственные белки, белковые фрагменты и полипептидные аналоги (такие как мутеины, варианты и слитые белки) белковой последовательности, а также посттрансляционно или иным



образом ковалентно или нековалентно модифицированные белки. Пептид, полипептид или белок может быть мономерным или полимерным.

"Вариант" полипептида (например, антитела) содержит аминокислотную последовательность, где в аминокислотной последовательности относительно другой полипептидной последовательности встроены, удалены и/или заменены один или несколько аминокислотных остатков. Описанные варианты включают, например, слитые белки.

"Производное" полипептида представляет собой полипептид (например, антитело), который химически модифицирован, например, посредством конъюгации с другой химической молекулой (например, такой как полиэтиленгликоль или альбумин, например сывороточный альбумин человека), фосфорилирования и гликозилирования. Если не указано иное, термин "антитело", кроме антител, содержащих две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, включает их производные, варианты, фрагменты и мутеины, примеры которых описаны ниже.

Связывающие антиген PD-L1 белки.

Настоящее изобретение относится к полностью человеческому антителу класса IgG, которое связывается с эпитопом PD-L1 с аффинностью связывания  $10^{-6}$ М или менее, которое содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и которое содержит последовательность переменного домена легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из. Предпочтительно, полностью человеческое антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где антитело содержит последовательности переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 (в настоящем описании обозначено как H6B1L-EM) и SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 3 (в настоящем описании обозначено как H6B1L-EV). Последовательности исходного антитела H6B1L и его вариантов -EM и -EV приведены в таблице последовательностей ниже. Антитела -EM и -EV против PD-L1, описываемые в настоящем документе, идентифицированы как обладающие преимуществами при экспрессии, в частности в клетках CHO, в которых отсутствует фрагментация.

Предпочтительно, антитело к PD-L1 (или фрагмент) по изобретению связывается с PD-L1 человека.

Антигенсвязывающие белки включают полностью человеческие моноклональные антитела, которые ингибируют биологическую активность PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления полностью человеческое антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий домен CDR3 (как определено с использованием системы нумерации Kabat), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи, содержащий домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления полностью человеческое антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и переменный домен легкой цепи, содержащий домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления полностью человеческое антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменный домен легкой цепи, содержащий домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления полностью человеческое антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR3, CDR2 и CDR1, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 6 и 5 соответственно, и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR3, CDR2 и CDR1, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10, 9 и 8 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полностью человеческому антителу класса IgG (например, IgG1 или IgG4), которое связывается с эпитопом PD-L1, где антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, и фрагмент содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, как приведено в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к полностью человеческому антителу класса IgG (например, IgG1 или IgG4), которое связывается с эпитопом PD-L1, где антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий домен CDR1, домен CDR2 и домен CDR3, как приведено в аминокислотных последовательностях SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7 соответственно, и содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, как приведено в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

Также по настоящему описанию предусмотрены фрагменты антител, где фрагмент антитела связывается с PD-L1 и содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, и содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, как приведено в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к фрагменту антитела к PD-L1, который содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий домен CDR1, домен CDR2 и домен CDR3, как приведено в аминокислотных последо-

вательностях SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7, соответственно, и содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, как приведено в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

Настоящее изобретение относится к фрагменту Fab полностью человеческого антитела, содержащему область переменного домена тяжелой цепи и область переменного домена легкой цепи, где последовательность переменного домена тяжелой цепи по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и он содержит последовательность переменного домена легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотным последовательностям. Предпочтительно, фрагмент Fab полностью человеческого антитела содержит и область переменного домена тяжелой цепи и область переменного домена легкой цепи, где антитело содержит последовательности переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент Fab полностью человеческого антитела содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR3 (как определено с использованием системы нумерации Kabat), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления фрагмент Fab полностью человеческого антитела содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления фрагмент Fab полностью человеческого антитела содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления фрагмент Fab полностью человеческого антитела содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR3, CDR2 и CDR1, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 6 и 5 соответственно, и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR3, CDR2 и CDR1, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10, 9 и 8 соответственно.

Антигенсвязывающие фрагменты антигенсвязывающих белков по изобретению могут быть получены общепринятыми способами. Примеры таких фрагментов включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab и F(ab')<sub>2</sub>.

Настоящее изобретение относится к одноцепочечному антителу человека, которое содержит область переменного домена тяжелой цепи и область переменного домена легкой цепи и пептидную линкерную связь областей переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи, где последовательность переменного домена тяжелой цепи по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и антитело содержит последовательность переменного домена легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3. Предпочтительно, полностью человеческое одноцепочечное антитело содержит область переменного домена тяжелой цепи и область переменного домена легкой цепи, где полностью человеческое одноцепочечное антитело содержит последовательности переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления одноцепочечное антитело человека содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR3 (как определено с использованием системы нумерации Kabat), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечное антитело человека содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечное антитело человека содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечное антитело человека содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR3, CDR2 и CDR1, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 6 и 5 соответственно, и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR3, CDR2 и CDR1, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10, 9 и 8 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения широкого спектра злокачественных опухолей млекопитающих или воспалительных заболеваний или аутоиммунных заболеваний, включающему введение эффективного количества полипептида против PD-L1, где полипептид против PD-L1 выбран из группы, состоящей из полностью человеческого антитела класса IgG, которое связывается с эпитопом PD-L1 с аффинностью связывания по меньшей мере 10<sup>-6</sup>M, фрагмента Fab полностью человеческого антитела, содержащего область переменного домена тяжелой цепи и область переменного до-

мена легкой цепи, одноцепочечного антитела человека, содержащего область переменного домена тяжелой цепи и область переменного домена легкой цепи и пептидную линкерную связь областей переменного домена тяжелой цепи и легкой цепи, и их сочетаний; где полностью человеческое антитело содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и оно содержит последовательность переменного домена легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотным последовательностям, где фрагмент Fab полностью человеческого антитела содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и антитело содержит последовательность переменного домена легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; и где одноцепочечное антитело человека содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и оно содержит последовательность переменного домена легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3.

Предпочтительно, полностью человеческое антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где антитело содержит последовательности переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 3. Предпочтительно, фрагмент Fab полностью человеческого антитела содержит область переменного домена тяжелой цепи и область переменного домена легкой цепи, где антитело содержит последовательности переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 3. Предпочтительно, полностью человеческое одноцепочечное антитело содержит область переменного домена тяжелой цепи и область переменного домена легкой цепи, где полностью человеческое одноцепочечное антитело содержит последовательности переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 3.

В конкретных вариантах осуществления аффинность связывания ( $K_a$ ) антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению с PD-L1 составляет по меньшей мере  $10^6$ . В других вариантах осуществления  $K_a$  антигенсвязывающих белков составляет по меньшей мере  $10^7$ , по меньшей мере  $10^8$ , по меньшей мере  $10^9$  или по меньшей мере  $10^{10}$ . В другом варианте осуществления  $K_a$  антигенсвязывающего белка является по существу такой же, как и у антитела, описанного в настоящем описании в примерах.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку с низкой скоростью диссоциации с PD-L1. В одном из вариантов осуществления  $K_{off}$  антигенсвязывающего белка составляет от  $1 \times 10^{-4}$  до  $1 \times 10^{-1}$  или ниже. В другом варианте осуществления значение  $K_{off}$  составляет от  $5 \times 10^{-5}$  до  $5 \times 10^{-1}$  или ниже. В другом варианте осуществления значение  $K_{off}$  по существу является таким же, как и у антитела, описанного в настоящем описании. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок связывается с PD-L1 по существу с таким же значением  $K_{off}$ , как и антитело, описанное в настоящем документе.

Параметры аффинности могут быть определены стандартными способами, известными в данной области, например BIACORE.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, который ингибирует активность PD-L1. В одном из вариантов осуществления  $IC_{50}$  антигенсвязывающего белка составляет 1000 нМ или менее. В другом варианте осуществления  $IC_{50}$  составляет 100 нМ или менее; в другом варианте осуществления  $IC_{50}$  составляет 10 нМ или менее. В другом варианте осуществления  $IC_{50}$  по существу является такой же, как у антитела, описанного в примерах в настоящем описании. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок ингибирует активность PD-L1 по существу с той же  $IC_{50}$ , что и антитело, описанное в настоящем описании.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, который связывается с PD-L1 человека, экспрессируемым на поверхности клетки и при таком связывании ингибирует сигнальную активность PD-L1 в клетке, не вызывая значительного снижения количества PD-L1 на поверхности клетки. Можно использовать любой способ определения или оценки количества PD-L1 на поверхности и/или внутри клетки. В других вариантах осуществления связывание антигенсвязывающего белка с экспрессирующей PD-L1 клеткой вызывает интернализацию PD-L1 с поверхности клетки менее чем приблизительно 75, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5, 1 или 0,1%.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку со временем полужизни *in vitro* или *in vivo* (например, при введении человеку) в течение по меньшей мере одних суток. В одном из вариантов осуществления время полужизни антигенсвязывающего белка составляет по меньшей мере трое суток. В другом варианте осуществления время полужизни антигенсвязывающего белка составляет четверо суток или более. В другом варианте осуществления время полужизни антигенсвязывающего белка составляет восемь суток или более. В другом варианте осуществления получают производное или модификацию антигенсвязывающего белка так, что их время полужизни является более

длительным по сравнению с недериватизированным или немодифицированным антигенсвязывающим белком. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок содержит одну или несколько таких точечных мутаций, увеличивающих время полужизни в сыворотке, как описано в WO 00/09560, включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

Настоящее изобретение также относится к полиспецифическим антигенсвязывающим белкам, например биспецифическим антигенсвязывающим белкам, например антигенсвязывающему белку, который связывается с двумя различными эпитопами PD-L1 или с эпитопом PD-L1 и эпитопом другой молекулы, посредством двух различных антигенсвязывающих участков или областей. Кроме того, как описано в настоящем документе, биспецифический антигенсвязывающий белок может содержать участок связывания PD-L1 одного из описанных в настоящем документе антител и вторую область связывания PD-L1 других описанных в настоящем документе антител, включая антитела, описанные в настоящем описании посредством ссылки на другие публикации. Альтернативно, биспецифический антигенсвязывающий белок может содержать антигенсвязывающий участок одного из описанных в настоящем документе антител и второй антигенсвязывающий участок другого антитела к PD-L1, которое известно в данной области, или антитела, которое получают известными способами или способами, описанными в настоящем документе.

В данной области известно множество способов получения биспецифических антител. Такие способы включают использование гибридных гибридом, как описано в Milstein et al., 1983, Nature 305:537, и химическое связывание фрагментов антител (Brennan et al., 1985, Science 229:81; Glennie et al., 1987, J. Immunol. 139:2367; патент США 6010902). Кроме того, биспецифические антитела могут быть получены рекомбинантными способами, например с использованием молекул с лейциновой застежкой (т.е. из белков Fos и Jun, которые предпочтительно образуют гетеродимеры; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547) или других доменных структур, взаимодействующих по типу ключ-замок, как описано в патенте США 5582996. Другие способы, которые подходят для получения антител, включают способы, которые описаны в патентах США 5959083 и 5807706.

В другом аспекте антигенсвязывающий белок содержит производное антитела. Производное антитела может содержать любую молекулу или вещество, которые придают антителу требуемое свойство, такое как повышенное время полужизни при конкретном применении. Например, производное антитело может содержать детектируемый (или метящий) фрагмент (например, радиоактивную, колориметрическую, антигенную молекулу или молекулу фермента, детектируемую гранулу (например, магнитную или электронно-плотную (например, золотую гранулу) или молекулу, которая связывается с другой молекулой (например, биотин или стрептавидин), терапевтическую или диагностическую молекулу (например, радиоактивную, цитотоксическую или фармацевтически активную молекулу) или молекулу, которая повышает применимость антитела для конкретного применения (например, введения индивидууму, такому как человек, или других применений *in vivo* или *in vitro*). Примеры молекул, которые можно использовать для получения производного антитела, включают альбумин (например, сывороточный альбумин человека) и полиэтиленгликоль (PEG). Связанные с альбумином и пегилированные производные антител могут быть получены хорошо известными в данной области способами. В одном из вариантов осуществления антитело конъюгировано или иным образом связано с транстиретином (TTR) или вариантом TTR. TTR или вариант TTR могут быть химически модифицированы, например, химическим соединением, выбранным из группы, состоящей из декстрана, поли(N-винилпирролидона), полиэтиленгликолей, гомополимеров пропопиленгликолей, сополимеров полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированных полиолов и поливиниловых спиртов.

В качестве антагонистов PD-L1 могут быть использованы олигомеры, которые содержат один или несколько антигенсвязывающих белков. Олигомеры могут находиться в форме ковалентно связанных или нековалентно связанных димеров, тримеров или олигомеров более высокого порядка. Для использования предусмотрены олигомеры, содержащие два или более антигенсвязывающих белков, и одним из примеров является гомодимер. Другие олигомеры включают гетеродимеры, гомотримеры, гетеротримеры, гомотетрамеры, гетеротетрамеры и т.д.

Один из вариантов осуществления относится к олигомерам, содержащим несколько антигенсвязывающих белков, связанных ковалентными или нековалентными связями между пептидными фрагментами, слитыми с антигенсвязывающими белками. Такие пептиды могут представлять собой пептидные линкеры (спейсеры) или пептиды, которые обладают свойством обеспечения олигомеризации. В числе пептидов, которые могут осуществлять олигомеризацию связанных с ними антигенсвязывающих белков, находятся лейциновые застежки и определенные полипептиды, получаемые из антител, как более подробно описано далее.

В конкретных вариантах осуществления олигомеры содержат от двух до четырех антигенсвязывающих белков. Антигенсвязывающие белки олигомера могут находиться в любой форме, такой как любая из форм, описанных выше, например варианты или фрагменты. Предпочтительно, олигомеры содержат антигенсвязывающие белки, которые обладают активностью связывания PD-L1.

В одном из вариантов осуществления олигомер получают с использованием полипептидов, получаемых из иммуноглобулинов. Получение слитых белков, содержащих определенные гетерологичные

полипептиды, слитые с различными частями полипептидов, получаемых из антител (включая домен Fc), описано, например, в Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535; Byrn et al., 1990, Nature 344:677 и Hollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", в Current Protocols in Immunology, прил. 4, стр. 10.19.1-10.19.11.

Один из вариантов осуществления относится к димеру, содержащему два слитых белка, полученному посредством слияния связывающего PD-L1 фрагмента антитела к PD-L1 с Fc-областью антитела. Димер может быть получен, например, путем введения слитого гена, кодирующего слитый белок, в подходящий экспрессирующий вектор, экспрессирующий слитый ген в клетках-хозяевах, трансформированных рекомбинантным экспрессирующим вектором, и обеспечивая сборку экспрессируемого слитого белка подобно молекулам антител, при этом происходит формирование межцепочечных дисульфидных связей между фрагментами Fc с получением димера.

Термин "полипептид Fc" включает нативные и мутеиновые формы полипептидов, получаемых из Fc-области антитела. Также этот термин включает укороченные формы таких полипептидов, содержащие шарнирную область, которая обеспечивает димеризацию. Слитые белки, содержащие фрагменты Fc (и олигомеры, образованные из них), обеспечивают преимущество легкой очистки посредством аффинной хроматографии на колонках с белком А или белком G.

Другой способ получения олигомерных антигенсвязывающих белков включает использование лейциновой застежки. Домены лейциновых застежек представляют собой пептиды, которые обеспечивают олигомеризацию белков, в которых их находят. Исходно лейциновые застежки идентифицировали в нескольких ДНК-связывающих белках (Landschulz et al., 1988, Science 240:1759), и с тех пор их выявили во множестве различных белков. В числе известных лейциновых застежек находятся природные пептиды и их производные, которые образуют димеры или тримеры. Примеры доменов лейциновых застежек, подходящих для получения растворимых олигомерных белков, описаны в WO 94/10308, а также включают лейциновую застежку, получаемую из поверхностно-активного белка D (SPD) легких, описанного в Hoore et al., 1994, FEBS Letters 344:191. Использование модифицированной лейциновой застежки, которая обеспечивает стабильную тримеризацию гетерологичного белка, слитого с ней, описано в Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78. В одном из подходов рекомбинантные слитые белки, содержащие фрагмент или производное антитела к PD-L1, слитые с пептидом лейциновой застежки, экспрессируют в подходящих клетках-хозяевах, и формируемые растворимые олигомерные фрагменты или производные антител к PD-L1 восстанавливают из супернатанта культуры.

Посттрансляционные модификации полипептидов.

В некоторых вариантах осуществления связывающие полипептиды по изобретению дополнительно могут содержать посттрансляционные модификации. Характерные посттрансляционные модификации белков включают фосфорилирование, ацетилирование, метилирование, ДЦФ-рибозилирование, убиквитинилирование, гликозилирование, карбонилирование, сумоилирование, биотинилирование или добавление боковой цепи полипептида или гидрофобной группы. В результате модифицированные растворимые полипептиды могут содержать не являющиеся аминокислотами элементы, такие как липиды, полиолы моносахариды и фосфаты. Предпочтительной формой гликозилирования является сиалирование, при котором с полипептидом конъюгируют один или несколько молекул сиаловых кислот. Молекулы сиаловых кислот повышают растворимость и время полужизни в сыворотке, при этом также снижая возможную иммуногенность белка. См. Raju et al. Biochemistry. 2001 31; 40(30):8868-76. Действие таких элементов, не являющихся аминокислотами, на функциональность полипептида может быть тестировано на их роль в качестве антагонистов функций PD-L1 или PD-1, например их ингибирующего действия на ангиогенез или рост опухолей.

В одном из вариантов осуществления модифицированные формы рассматриваемых растворимых полипептидов содержат связь рассматриваемых растворимых полипептидов с небелковыми полимерами. В одном конкретном варианте осуществления, полимером является полиэтиленгликоль ("PEG"), полипропиленгликоль или полиоксисилклены, как изложено в патентах США 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337.

PEG представляет собой водорастворимый полимер, который является коммерчески доступным или который может быть получен посредством полимеризации этиленгликоля с раскрытием кольца хорошо известными в данной области способами (Sandier and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, том 3, стр. 138-161). Термин "PEG" используют в широком смысле с включением любой молекулы полиэтиленгликоля, вне зависимости от размера или модификации на концах PEG, и его можно представить формулой:  $X-O(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2OH$  (1), где n составляет собой число от 20 до 2300, а X представляет собой H или концевую модификацию, например  $C_{1-4}$ алкил. В одном из вариантов осуществления PEG по изобретению на одном из концов оканчивается гидроксигруппой, т.е. X представляет собой H или  $CH_3$  ("метокси-PEG"). PEG может содержать дополнительные химические группы, которые необходимы для реакций связывания; которые являются результатом химического синтеза молекулы; или которые представляют собой спейсеры для оптимального расстояния между частями молекулы. Кроме того, такой PEG может состоять из одной или нескольких боковых цепей PEG, которые связаны друг с другом. PEG более чем с одной цепью PEG называют многоцепочечными или разветвленными PEG. Раз-

ветвленные PEG можно получать, например, посредством добавления полиэтиленоксида к различным полиолам, включая глицерин, пентаэритрит и сорбит. Например, четырехцепочечный разветвленный PEG можно получать из пентаэритрита и этиленоксида. Разветвленные PEG описаны, например, в EP-A 0473084 и патенте США 5932462. Одна из форм PEG содержит две боковых цепи PEG (PEG2), связанных первичными аминогруппами лизина (Monfardini et al., *Bioconjugate Chem.* 6 (1995)62-69).

Хотя PEG хорошо известен, насколько известно авторам изобретения, в настоящей заявке впервые продемонстрировано, что пегелированный полипептид  $^{10F}$ p3 можно пегелировать, и он будет сохранять лигандсвязывающую активность. В предпочтительном варианте осуществления пегелированный полипептид  $^{10F}$ p3 получают посредством сайт-специфического пегелирования, в частности посредством конъюгации PEG с остатком цистеина на N- или C-конце. Таким образом, настоящее изобретение относится к связывающему мишень полипептиду  $^{10F}$ p3 с улучшенными фармакокинетическими свойствами, где полипептид содержит домен  $^{10F}$ p3, содержащий приблизительно от 80 приблизительно до 150 аминокислот, где по меньшей мере одна из петель указанного домена  $^{10F}$ p3 участвует в связывании мишени; и ковалентно связанную молекулу PEG, где указанный полипептид  $^{10F}$ p3 связывается с мишенью с  $K_D$  менее 100 нМ и его скорость клиренса у млекопитающего составляет менее 30 мл/ч/кг. Фрагмент PEG может быть связан с полипептидом  $^{10F}$ p3 посредством сайт-специфического пегелирования, такого как посредством связывания с остатком Cys, где остаток Cys может находиться на N-конце полипептида  $^{10F}$ p3 или между N-концом и наиболее N-концевой бета- или бета-подобной цепью или на C-конце полипептида  $^{10F}$ p3 или между C-концом и наиболее C-концевой  $\beta$ - или  $\beta$ -подобной цепью. Также остаток Cys может находиться в других положениях, в частности, в любой из петель, которые не участвуют в связывании мишени. Молекула PEG также может быть связана посредством других химических реакций, включая конъюгацию с аминами.

Как правило, конъюгация PEG с пептидами или белками включает активацию PEG и связывание активированных промежуточных соединений PEG непосредственно с белками/пептидами-мишенями или с линкером, который затем активируют и связывают с белками/пептидами-мишенями (см. Abuchowski et al., *J. Biol. Chem.*, 252, 3571 (1977) и *J. Biol. Chem.*, 252, 3582 (1977), Zalipsky et al., и Harris et. al., в: *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*; (ред. J.M. Harris) Plenum Press: New York, 1992; гл. 21 и 22). Следует отметить, что связывающий полипептид, содержащий молекулу PEG, также известен как конъюгированный белок, тогда как белок, не содержащий связанную молекулу PEG, можно обозначать как неконъюгированный.

Для конъюгации со связывающими PD-L1 полипептидами могут быть выбраны формы PEG с различными молекулярными массами, например приблизительно от 1000 дальтонов (Да) до 100000 Да (n составляет от 20 до 2300). Количество повторяющихся единиц "n" в PEG приблизительно получают по молекулярной массе, выраженной в дальтонах. Предпочтительно общая молекулярная масса PEG на активированном линкере подходит для фармацевтического применения. Таким образом, в одном из вариантов осуществления молекулярная масса молекул PEG не превышает 100000 Да. Например, если с линкером связаны три молекулы PEG, где каждая молекула PEG обладает одинаковой молекулярной массой 12000 Да (каждый n приблизительно равен 270), то общая молекулярная масса PEG на линкере составляет приблизительно 36000 Да (общее n составляет приблизительно 820). Молекулярные массы PEG, связанные с линкером, также могут различаться, например, из трех молекул на линкере две молекулы PEG могут составлять по 5000 Да каждая (каждое n составляет приблизительно 110), и одна молекула PEG может составлять 12000 Да (n составляет приблизительно 270).

В конкретном варианте осуществления изобретения связывающий PD-L1 полипептид ковалентно связан с одной группой поли(этиленгликоля) формулы:  $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$ , где  $-\text{CO}$  (т.е. карбонил) группы поли(этиленгликоля) формирует амидную связь с одной из аминогрупп связывающего полипептида; R представляет собой низший алкил; x представляет собой 2 или 3; m представляет собой приблизительно от 450 до приблизительно 950; и n и m выбирают так, чтобы молекулярная масса конъюгата без связывающего полипептида составляла приблизительно от 10 до 40 кДа. В одном из вариантов осуществления аминогруппа в положении 6 лизина связывающего полипептида является доступной (свободной) аминогруппой.

Указанные выше конъюгаты могут быть более конкретно представить формулой (II):  $\text{P-NHCO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$  (II), где P представляет собой группу связывающего полипептида, как описано в настоящем документе (т.е. без аминогруппы или аминогрупп, которые образуют амидную связь с карбониллом, приведенным в формуле (II); и где R представляет собой низший алкил; x представляет собой 2 или 3; m представляет собой приблизительно от 450 приблизительно до 950 и его выбирают так, чтобы молекулярная масса конъюгата без связывающего полипептида составляла приблизительно от 10 приблизительно до 40 кДа. Как используют в настоящем описании, приводимые диапазоны "m" имеют ориентировочное значение. Диапазоны "m" определяют в любом случае и точно по молекулярной массе группы PEG.

Специалист в данной области сможет выбрать подходящую молекулярную массу PEG, например, на основе терапевтического использования пегелированного связывающего полипептида, желаемой дозы, времени циркуляции, устойчивости к протеолизу, иммуногенности и других факторов. Для описания

PEG и его использования для улучшения свойств белков см. Katre, *Advanced Drug Delivery Reviews* 10:91-114(1993).

В одном из вариантов осуществления молекулы PEG могут быть активированы для реакции с аминогруппами на связывающем полипептиде, например с остатками лизина (Bencham et al., *Anal. Biochem.*, 131, 25 (1983); Veronese et al., *Appl. Biochem.*, 11, 141 (1985); Zalipsky et al., *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems*, adrs 9-110 ACS Symposium Series 469 (1999); Zalipsky et al., *Europ. Polym. J.*, 19, 1177-1183 (1983); Delgado et al., *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 12, 119-128 (1990)).

В одном из некоторых вариантов осуществления для получения конъюгатов PEG-связывающий полипептид используют сложные эфиры карбоновых кислот и PEG. Могут быть использованы N,N'-дисукцинимидилкарбонат (DSC) в реакции с PEG с получением активного смешанного PEG-сукцинимидилкарбоната, который затем может реагировать с нуклеофильной группой линкера или аминогруппой связывающего полипептида (см. патенты США 5281698 и 5932462). В реакции схожего типа 1,1'-(дибензотриазолил)карбонат и ди-(2-пиридил)карбонат могут реагировать с PEG с образованием смешанного PEG-бензотриазолил- и PEG-пиридилкарбоната (патент США 5382657) соответственно.

Пегилирование полипептида <sup>10F</sup>n3 может быть осуществлено способами на предшествующем уровне техники, например посредством реакции связывающего полипептида с электрофильно активными PEG (поставщик: Shearwater Corp., USA, [www.shearwatercorp.com](http://www.shearwatercorp.com)). Предпочтительные реагенты PEG по настоящему изобретению представляют собой, например, N-гидроксисукцинимидилпропионаты (PEG-SPA), бутаноаты (PEG-SBA), PEG-сукцинимидилпропионат или разветвленные N-гидроксисукцинимиды, такие как mPEG2-NHS (Monfardini et al., *Bioconjugate Chem.* 6(1995)62-69). Такие способы можно использовать для пегилирования по f-аминогруппе лизина связывающего полипептида или N-концевой аминогруппе связывающего полипептида.

В другом варианте осуществления молекулы PEG можно связывать с сульфгидрильными группами на связывающем полипептиде (Sartore et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 27, 45 (1991); Morpurgo et al., *Bioconjug. Chem.*, 7, 363-368 (1996); Goodson et al., *Bio/Technology* (1990) 8, 343; патент США 5766897). В патентах США 6610281 и 5766897 описаны иллюстративные реакционноспособные молекулы PEG, которые можно связывать с сульфгидрильными группами.

В некоторых вариантах осуществления, где молекулы PEG конъюгированы с остатками цистеина на связывающем полипептиде, остатки цистеина являются природными для связывающего полипептида, тогда как в других вариантах осуществления один или несколько остатков цистеина встраивают в связывающий полипептид. Для получения остатков цистеина в кодирующую последовательность связывающего полипептида можно вносить мутации. Это можно осуществлять, например, мутируя один или несколько аминокислотных остатков в цистеин. Предпочтительные аминокислоты для мутации в остаток цистеина включают серин, треонин, аланин и другие гидрофильные остатки. Предпочтительно, остаток для мутации в цистеин представляет собой поверхностный остаток. В данной области хорошо известны алгоритмы прогноза доступности остатков на поверхности на основе первичной последовательности или белка. Альтернативно, поверхностные остатки могут быть спрогнозированы путем сравнения аминокислотных последовательностей связывающих полипептидов при условии, что кристаллическая структура каркаса, на основе которого конструируют и видоизменяют связывающие полипептиды, определена (см. Himanen et al., *Nature*, (2001) 20-27; 414(6866):933-8) и, таким образом, идентифицированы поверхностные остатки. В одном из вариантов осуществления остатки цистеина вводят в связывающие полипептиды на N- и/или C-концах или рядом с ними или в областях петель.

В некоторых вариантах осуществления пегилированный связывающий полипептид содержит молекулу PEG, ковалентно связанную с α-аминогруппой N-концевой аминокислоты. Сайт-специфическое N-концевое восстановительное аминирование описано в Pepinsky et al., (2001) *JPET*, 297, 1059 и в патенте США 5824784. Использование PEG-альдегида для восстановительного аминирования белка с использованием других доступных нуклеофильных аминогрупп описано в патенте США 4002531, в Wieder et al., (1979) *J. Biol. Chem.* 254,12579 и в Chamow et al., (1994) *Bioconjugate Chem.* 5, 133.

В другом варианте осуществления пегилированный связывающий полипептид содержит одну или несколько молекул PEG, ковалентно связанных с линкером, который в свою очередь связан с α-аминогруппой аминокислотного остатка на N-конце связывающего полипептида. Такой подход описан в публикации патента США 2002/0044921 и в WO 094/01451.

В одном из вариантов осуществления связывающий полипептид пегилирован на C-конце. В конкретном варианте осуществления белок пегилирован на C-конце посредством введения C-концевого азидометионина и последующей конъюгации соединения метил-PEG-триарилфосфина посредством реакции Штаудингера. Этот способ C-концевой конъюгации описан в Cazalis et al., *Bioconjug. Chem.* 2004; 15 (5):1005-1009.

Монопегилирование связывающего полипептида также может быть проведено общими способами, описанными в WO 94/01451. В WO 94/01451 описан способ получения рекомбинантного полипептида с модифицированной реакционноспособной группой α-углерода концевой аминокислоты. Этапы способа включают получение рекомбинантного полипептида и его защиту с использованием одной или несколь-



ких биологически добавляемых защитных групп на N-концевом  $\alpha$ -амине и C-концевом  $\alpha$ -карбоксиле. Затем можно проводить реакцию полипептида с химическими защитными средствами для селективной защиты реакционноспособных групп боковых цепей и, таким образом, для предотвращения модификаций групп боковых цепей. Затем проводят расщепление полипептида расщепляющим реагентом, специфичным для биологической защитной группы с получением незащищенной реакционноспособной группы  $\alpha$ -углерода концевой аминокислоты. Незащищенную реакционноспособную группу  $\alpha$ -углерода концевой аминокислоты модифицируют химическим модифицирующим средством. Затем в полипептиде с защитой боковых цепей и одной копией концевой модификации снимают защиту с групп боковых цепей с формированием рекомбинантного полипептида с одной копией концевой модификации. Для проведения селективной модификации по N- и/или C-концевой аминокислоте полипептида количество и последовательность этапов способа можно изменять.

Отношение связывающего полипептида и активированного PEG в реакции конъюгации может составлять приблизительно от 1:0,5 до 1:50, приблизительно от 1:1 до 1:30 или приблизительно от 1:5 до 1:15. В способе по настоящему изобретению для катализа ковалентного присоединения PEG к связывающему полипептиду можно использовать различные водные буферы. В одном из вариантов осуществления pH используемого буфера составляет приблизительно от 7,0 до 9,0. В другом варианте осуществления pH находится в незначительно щелочном диапазоне, например приблизительно от 7,5 до 8,5. Можно использовать буферы с рКа, близким к нейтральному диапазону pH, например фосфатный буфер.

Для очистки пегилированного связывающего полипептида могут быть использованы общепринятые способы разделения и очистки, известные в данной области, такие как эксклюзионная (например, гелефильтрационная) и ионообменная хроматография. Продукты также можно разделять с использованием SDS-PAGE. Продукты, которые можно разделять, включают моно-, ди-, три-, поли- и непегилированный связывающий полипептид, а также свободный PEG. Процент моно-PEG конъюгатов можно контролировать, объединяя более широкие фракции вокруг пика элюирования с увеличением в композиции процента моно-PEG. Хорошим балансом выхода и активности являются конъюгаты с содержанием моно-PEG приблизительно 90%. Желательными могут являться композиции, в которых моно-PEG частицами являются, например, по меньшей мере 92% или по меньшей мере 96% конъюгатов. В одном из вариантов осуществления изобретения процентное содержание моно-PEG конъюгатов составляет от 90 до 96%.

В одном из вариантов осуществления пегилированный связывающий полипептид по изобретению содержит одну, два или более молекул PEG. В одном из вариантов осуществления молекула(ы) PEG связана с аминокислотным остатком, который находится на поверхности белка и/или удален от поверхности, которая контактирует с лигандом-мишенью. В одном из вариантов осуществления объединенная или общая молекулярная масса PEG в PEG-связывающем полипептиде составляет приблизительно от 3000 до 60000 Да, необязательно приблизительно от 10000 до 36000 Да. В одном из вариантов осуществления PEG в пегилированном связывающем полипептиде представляет собой по существу линейный PEG с неразветвленной цепью.

В одном из вариантов осуществления гидролитического отщепления PEG в пегилированном связывающем полипептиде от пегилированного аминокислотного остатка при использовании анализа с гидроксиламином, например 450 мМ гидроксиламина (pH 6,5) в течение от 8 до 16 ч при комнатной температуре, не происходит, и, таким образом, он является стабильным. В одном из вариантов осуществления более чем 80% композиции представляет собой стабильный моно-PEG-связывающий полипептид, более предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95%.

В другом варианте осуществления пегилированные связывающие полипептиды по изобретению предпочтительно сохраняют по меньшей мере 25, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95 или 100% биологической активности, ассоциированной с немодифицированным белком. В одном из вариантов осуществления биологическая активность относится к его способности связываться с PD-L1, как оценивают по  $K_D$ ,  $k_{on}$  или  $k_{off}$ . В одном конкретном варианте осуществления белок с пегилированным связывающим полипептидом демонстрирует увеличение связывания с PD-L1 относительно непегилированного связывающего полипептида.

Скорость клиренса модифицированного PEG полипептида из сыворотки относительно скорости клиренса немодифицированного связывающего полипептида может снижаться приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или даже 90%. Модифицированный PEG полипептид может обладать временем полужизни ( $t_{1/2}$ ), которое увеличено относительно времени полужизни немодифицированного белка. Время полужизни PEG-связывающего полипептида может быть повышено относительно времени полужизни немодифицированного связывающего полипептида по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400 или 500 или даже на 1000%. В некоторых вариантах осуществления время полужизни белка определяют *in vitro*, например, в буферном физиологическом растворе или в сыворотке. В других вариантах осуществления время полужизни белка представляет собой время полужизни *in vivo*, такое как время полужизни белка в сыворотке или другой биологической жидкости животного.

Терапевтические способы, составы и способы введения.

Некоторые способы по изобретению включают введение связывающего PD-L1 антигенсвязываю-



шего белка индивидууму, таким образом снижая индуцированный PD-L1 биологический ответ, который играет роль в конкретном патологическом состоянии. В конкретных вариантах осуществления способы по изобретению включают приведение эндогенного PD-L1 в контакт со связывающим PD-L1 антигенсвязывающим белком, например, посредством введения индивидууму или способом *ex vivo*.

Термин "лечение" включает облегчение или предотвращение по меньшей мере одного симптома или другой аспекта нарушения или снижение тяжести заболевания и тому подобное. Для того чтобы быть эффективным терапевтическим средством, антигенсвязывающий белок не обязательно должен обеспечивать полное излечение или устранение каждого симптома или проявления заболевания. Как известно в соответствующей области, для того чтобы считаться эффективными терапевтическими средствами, лекарственные средства, используемые в качестве терапевтических средств, могут снижать тяжесть заданного состояния болезни, но не обязательно должны устранять каждое проявление заболевания. Подобным образом, для того чтобы считаться эффективным профилактическим средством, профилактически вводимое лечебное средство не обязательно должно являться полностью эффективным в отношении предотвращения дебюта патологического состояния. Достаточным является простое снижение воздействия заболевания (например, снижения количества или тяжести его симптомов или увеличения эффективности другого лечебного средства или обеспечение другого положительного эффекта) или уменьшение вероятности возникновения или прогрессирования заболевания у индивидуума. Один из вариантов осуществления изобретения относится к способу, включающему введение пациенту антагониста PD-L1 в количестве и в течение периода времени, достаточных для обеспечения длительного улучшения относительно исходного уровня показателя, который отражает тяжесть конкретного нарушения.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения патологических состояний или предотвращения предпосылок патологических состояний, которые реагируют на ингибирование биологической активности PD-L1. Предпочтительными примерами являются состояния, характеризующиеся воспалением или гиперпролиферацией клеток. Способы и дозы введения изменяются в зависимости от типа конкретного полипептида и конкретного патологического состояния, подлежащего лечению, но специалист в данной области легко может их определить. Как правило, регулирующие органы требуют формулировать используемый в качестве терапевтического средства белковый реагент так, чтобы он содержал приемлемо низкие уровни пирогенов. Таким образом, терапевтические составы, как правило, отличаются от других составов тем, что они по существу не содержат пирогенов или, по меньшей мере, содержат не более, чем приемлемые уровни пирогена, как определено соответствующим регулирующим органом (например, FDA).

Как известно в соответствующей области, фармацевтические композиции, содержащие антитела и их фрагменты по изобретению, вводят индивидууму таким образом, который соответствует показанию. Таким образом, изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую антитело к PD-L1 (или фрагмент), описываемое в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтические композиции можно вводить любым подходящим способом, включая в качестве неограничивающих примеров парентеральный способ, местный способ или посредством ингаляции. В случае инъекции фармацевтическую композицию можно вводить, например, посредством внутрисуставного, внутривенного, внутримышечного, внутриочагового, интраперитонеального или подкожного маршрутов, посредством болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Предусмотрено локальное введение, например, в участке заболевания или повреждения, как при трансдермальной доставке и замедленном высвобождении из имплантатов. Доставка посредством ингаляции включает, например, назальную или пероральную ингаляцию, использование распылителя, ингаляцию антагониста в аэрозольной форме и тому подобное. Другие альтернативы включают глазные капли; пероральные препараты, включая пилюли, сиропы, таблетки-леденцы или жевательные резинки; и местные препараты, такие как лосьоны, гели, спреи и мази.

Преимущественно антигенсвязывающие белки вводят в форме композиции, содержащей один или несколько дополнительных компонентов, таких как физиологически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель. Необязательно, композиция дополнительно содержит одно или несколько физиологически активных средств, например второе ингибирующее воспаление или иммунную систему средство, антиангиогенное средство, анальгетическое средство и т.д., неисключающие примеры которых представлены в настоящем описании. В различных конкретных вариантах осуществления композиция в дополнение к связывающему PD-L1 антигенсвязывающему белку содержит одно, два, три, четыре, пять или шесть физиологически активных средств.

Терапевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить с фармацевтически приемлемыми разбавителем, носителем или эксципиентом в стандартной лекарственной форме. В качестве неограничивающих примеров введение может являться парентеральным (например, внутривенным, подкожным), пероральным или топическим. Кроме того, можно использовать любой способ генной терапии с использованием нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды по изобретению, такой как доставка депротенинизированной ДНК, рекомбинантные гены и векторы, доставка на основе клеток, включая обработку клеток пациента *ex vivo*, и тому подобное.

Композиция может находиться в форме пилюли, таблетки, капсулы, жидкости или таблетки с дли-

тельным высвобождением для перорального введения; или жидкости для внутривенного, подкожного или парентерального введения; геля, лосьона, мази, крема или полимера или другого носителя с длительным высвобождением для местного введения.

Хорошо известные в данной области способы получения составов можно найти, например, в "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20-е изд., ред. A.R. Gennaro, 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). Например, составы для парентерального введения могут содержать эксципиенты, стерильную воду, физиологический раствор, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения или гидрогенизированные нафталены. Для контроля высвобождения соединений можно использовать биосовместимый, биоразлагаемый лактидный полимер, сополимер лактида/гликолида или сополимеры полиоксиэтилена-полиоксипропилена. Для контроля биораспределения соединений можно использовать составы в форме наночастиц (например, биоразлагаемых наночастиц, твердых липидных наночастиц, липосом). Другие потенциально эффективные парентеральные системы доставки включают частицы сополимеров этилена-винилацетата, осмотические насосы, имплантируемые инфузионные системы и липосомы. Концентрация соединения в составе варьирует в зависимости от ряда факторов, включающих вводимую дозу лекарственного средства и маршрут введения.

Полипептид необязательно можно вводить в виде фармацевтически приемлемой соли, такой как нетоксичные соли присоединения кислот или комплексные соединения с металлами, которые широко используют в фармацевтической промышленности. Примеры солей присоединения кислот включают органические кислоты, такие как уксусная, молочная, палмовая, малеиновая, лимонная, яблочная, аскорбиновая, янтарная, бензойная, пальмитиновая, субериновая, салициловая, винная, метансульфоновая, толуолсульфоновая или трифторуксусная кислоты или тому подобное; полимерные кислоты, такие как дубильная кислота, карбоксиметилцеллюлоза или тому подобное; и неорганические кислоты, такие как соляная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, фосфорная кислота или тому подобное. Комплексные соединения с металлами содержат цинк, железо и тому подобное. В одном из примеров полипептид формулируют в присутствии ацетата натрия для увеличения термостабильности.

Составы для перорального приема включают таблетки, содержащие активный ингредиент(ы) в смеси с нетоксичным фармацевтически приемлемыми эксципиентами. Эти эксципиенты могут представлять собой, например, инертные разбавители или наполнители (например, сахарозу и сорбит), смазки, способствующие скольжению средства и противоадгезивные средства (например, стеарат магния, стеарат цинка, стеариновая кислота, диоксиды кремния, гидрогенизированные растительные масла или тальк). Составы для перорального приема также можно предоставлять в виде жевательных таблеток или в виде твердых желатиновых капсул, где активный ингредиент смешивают с инертным твердым разбавителем, или в виде мягких желатиновых капсул, где активный ингредиент смешивают с водной или масляной средой.

Терапевтически эффективная доза относится к дозе, которая обеспечивает терапевтическое действие, для которого ее вводят. Точная доза зависит от подлежащего лечению нарушения, и ее известными способами может определить специалист в данной области. Как правило, полипептид вводят приблизительно в дозах от 0,01 мкг/кг до приблизительно 50 мкг/кг в сутки, предпочтительно от 0,01 мкг/кг до приблизительно 30 мкг/кг в сутки, наиболее предпочтительно от 0,1 мкг/кг до приблизительно 20 мкг/кг в сутки. Полипептид можно вводить ежедневно (например, один раз, два раза, три раза или четыре раза в сутки) или, предпочтительно, менее часто (например, еженедельно, каждые две недели, каждые три недели, ежемесячно или ежеквартально). Кроме того, как известно в данной области, могут являться необходимыми корректировки по возрасту, а также массе тела, общему состоянию здоровья, полу, диете, времени введения, взаимодействию лекарственных средств и тяжести заболевания, и специалисты в данной области могут определять это посредством стандартных экспериментов.

Связывающие PD-L1 белки по настоящему изобретению и родственные им варианты могут использоваться в ряде терапевтических и диагностических применений. Они включают ингибирование биологической активности PD-L1 посредством конкуренции или блокирования связывания PD-L1, а также доставку цитотоксических или визуализирующих молекул в клетки, предпочтительно клетки, экспрессирующие PD-L1. Небольшой размер и стабильная структура этих молекул могут являться особенно полезными для производства лекарственного средства, быстрого клиренса из организма при некоторых применениях, где необходим быстрый клиренс, или для формулирования в новые системы доставки, которые пригодны или улучшаемы с использованием молекулы с такими характеристиками.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способам лечения индивидуума. Например, способ может производить в целом благотворное действие на индивидуума, например способ может увеличивать ожидаемую продолжительность жизни индивидуума. Альтернативно, способом можно, например, лечить, предотвращать, вылечивать, облегчать или снижать тяжесть, нарушения, патологического состояния или расстройство ("патологическое состояние"). В числе подлежащих лечению патологических состояний находятся патологические состояния, характеризующиеся неадекватной экспрессией или активностью PD-L1. При некоторых таких патологических состояниях уровень экспрессии или активности является слишком высоким, и лечение включает введение антагониста PD-L1, как описано в настоящем документе. Нарушения или патологические состояния связаны со злокачественными опухо-

лями. В частности, такие злокачественные опухоли включают, но не ограничиваются ими, карциному легких, яичников и толстой кишки, а также различные миеломы.

Конкретные патологические состояния и заболевания, которые можно лечить или предотвращать с использованием антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению, включают различные злокачественные опухоли.

На основе их эффективности в качестве ингибиторов биологической активности PD-L1 полипептиды по настоящему изобретению эффективны против ряда злокачественных состояний, а также осложнений, возникающих вследствие злокачественных опухолей, таких как плевральный выпот и асцит. Предпочтительно, связывающие PD-L1 полипептиды по настоящему изобретению можно использовать для лечения или предотвращения гиперпролиферативных заболеваний или злокачественных опухолей и метастатического распространения злокачественных опухолей. Предпочтительные показания для описываемых антител к PD-L1 включают различные виды колоректального рака, различные виды рака головы и шеи, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких (NSCLC) и рак поджелудочной железы. Неограничивающие примеры злокачественных опухолей включают злокачественные опухоли мочевого пузыря, крови, костей, головного мозга, молочной железы, хрящевой ткани, толстой кишки, почек, печени, легких, лимфатических узлов, нервной ткани, яичников, поджелудочной железы, предстательной железы, скелетных мышц, кожи, спинного мозга, селезенки, желудка, семенников, тимуса, щитовидной железы, трахеи, мочеполовых путей, мочеточника, мочеиспускательного канала, матки или влагалища. В некоторых вариантах осуществления подлежащая лечению злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака яичников, рака толстой кишки, рака молочной железы или печеночной карциномы, миеломы, опухоли ЦНС нейробластного происхождения, моноцитарного лейкоза, В-клеточного лейкоза, Т-клеточного лейкоза, В-клеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, опухоли из тучных клеток и любого их сочетания.

В некоторых вариантах осуществления широкий спектр подлежащих лечению злокачественных опухолей млекопитающих выбран из группы, состоящей из рака яичника, толстой кишки, молочной железы, легких, миелом, опухолей ЦНС нейробластного происхождения, моноцитарных лейкозов, В-клеточных лейкозов, Т-клеточных лейкозов, В-клеточных лимфом, Т-клеточных лимфом, опухолей из тучных клеток и их сочетаний. Предпочтительно, аутоиммунное заболевание или воспалительное заболевание выбраны из группы, состоящей из воспаления слизистой кишечника, синдрома изнурения, ассоциированного с колитом, рассеянного склероза, системной красной волчанки, вирусных инфекций, ревматоидного артрита, остеоартрита, псориаза, болезни Крона и воспалительного заболевания кишечника.

Кроме того, описываемыми в настоящем документе связывающими полипептидами к PD-L1 можно лечить различные воспалительные нарушения. Такие воспалительные нарушения включают, например, болезни изнурения с воспалением слизистой кишечника, связанные с колитом, рассеянный склероз, системную красную волчанку, вирусные инфекции, ревматоидный артрит, остеоартрит, псориаз и болезнь Крона.

Также предусмотрено использование антигенсвязывающих белков в способах *ex vivo*. Например, кровь пациента или другую физиологическую жидкость можно *ex vivo* приводить в контакт с антигенсвязывающим белком, который связывается с PD-L1. Антигенсвязывающий белок может быть связан с подходящим нерастворимым матриксом или материалом твердой подложки.

Связывающий PD-L1 полипептид можно вводить отдельно или использовать в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, такими как химиотерапия, лучевая терапия, иммунотерапия, хирургическое вмешательство или любая их комбинация. Также в рамках других стратегий лечения возможна длительная терапия в качестве вспомогательной терапии, как описано выше.

В другом варианте осуществления способ включает введение одного или нескольких антагонистов PD-L1, описываемых в настоящем документе, и проведение одного или нескольких других способов лечения (например, терапевтического или паллиативного лечения). Когда способ включает проведение более одного способа лечения индивидуума, следует понимать, что порядок, время, количество, концентрация и объем введений ограничены только медицинскими требованиями и ограничениями лечения, т.е. индивидууму можно проводить два вида лечения, например одновременно, последовательно, поочередно или по любой другой схеме лечения.

Таким образом, в другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума ингибирующим PD-L1 антигенсвязывающим белком и одним или несколькими другими терапевтическими средствами. В одном из вариантов осуществления такое комбинированное лечение обеспечивает синергию или аддитивный эффект, например, вследствие воздействия на несколько участков или молекулярных мишеней в опухоли. Типы способов комбинированного лечения, которое можно использовать по настоящему изобретению, включают ингибирование или активацию (в зависимости от ситуации) множества узлов в одном связанном с заболеванием пути, множества путей в клетке-мишени и множества типов клеток в ткани-мишени.

В другом варианте осуществления способ комбинированного лечения включает введение индивидууму двух, трех, четырех, пяти, шести или более агонистов или антагонистов PD-L1, описанных в на-

стоящем описании. В другом варианте осуществления способ включает введение индивидууму двух или более препаратов, которые вместе ингибируют или активируют (непосредственно или опосредованно) опосредованную PD-L1 передачу сигнала. Примеры таких способов включают использование комбинаций двух или более ингибирующих PD-L1 антигенсвязывающих белков, ингибирующего PD-L1 антигенсвязывающего белка и одной или нескольких других терапевтических молекул, обладающих свойствами противораковыми свойствами (например, цитотоксических средств и/или иммуномодуляторов), или введение ингибирующего PD-L1 антигенсвязывающего белка и проведение одного или нескольких других способов лечения (например, хирургического вмешательства или облучения). Кроме того, одно или несколько антител к PD-L1 или производных антител можно использовать в комбинации с одной или несколькими молекулами или другими способами лечения, где другая молекула(ы) и/или способ(ы) лечения непосредственно не связывают или не влияют на PD-L1, но комбинация которых эффективна для лечения или предотвращения подлежащего лечению патологического состояния. В одном из вариантов осуществления одна или несколько молекул и/или способов лечения осуществляют лечение или предотвращают патологическое состояние, обусловленное одной или несколькими из других молекул или способов лечения в ходе терапии, например, тошноту, усталость, алопецию, кахексию, бессонницу и т.д. В каждом случае, где используют комбинацию молекул и/или других способов лечения, конкретные молекулу(ы) и/или способы лечения можно вводить/проводить в любом порядке, в течение любого периода времени, который является эффективным, например, одновременно, последовательно или поочередно. В одном из вариантов осуществления способ лечения включает завершение первого курса лечения с использованием одной молекулы или другого способа лечения перед началом второго курса лечения. Период времени между концом первого курса лечения и началом второго курса лечения может представлять собой любой период времени, который обеспечивает эффективность общего курса лечения, например, несколько секунд, минут, часов, суток, недель, месяцев или даже лет.

В некоторых вариантах осуществления конкретные средства в виде антител к PD-L1 по изобретению можно использовать по отдельности. Альтернативно, конкретные средства можно использовать в комбинации с другими общепринятыми терапевтическими подходами против злокачественных опухолей, направленными на лечение или предотвращение пролиферативных нарушений (например, опухолей). Например, такие способы можно использовать при профилактическом предотвращении злокачественных опухолей, предотвращении рецидивов злокачественных опухолей и метастазов после хирургического вмешательства и в качестве вспомогательного средства при другом общепринятом лечении злокачественной опухоли. В настоящем описании полагают, что при применении рассматриваемого полипептидного терапевтического средства можно повысить эффективность общепринятых способов лечения злокачественных опухолей (например, химиотерапии, лучевой терапии, фототерапии, иммунотерапии и хирургического вмешательства).

В некоторых вариантах осуществления таких способов одно или несколько полипептидных терапевтических средств можно вводить совместно (одновременно) или в различные моменты времени (последовательно). Кроме того, полипептидные терапевтические средства можно вводить с другими типами соединений для лечения злокачественных опухолей или для ингибирования ангиогенеза.

Показано, что антинеопластической активностью обладает широкий спектр общепринятых соединений. Эти соединения использовали в качестве фармацевтических средств в химиотерапии для уменьшения размеров солидных опухолей, предотвращения метастазов и дальнейшего роста или уменьшения количества злокачественных клеток при лейкемических или костномозговых злокачественных новообразованиях. Хотя химиотерапия эффективна при лечении злокачественных новообразований различных типов, многие антинеопластические соединения вызывают нежелательные побочные эффекты. Показано, что, когда комбинируют два или более различных терапевтических средств, терапевтические средства могут действовать синергически и обеспечивать снижение дозы каждого из этих терапевтических средств, таким образом снижая вредные побочные эффекты, вызываемые каждым соединением в более высоких дозах. В других случаях злокачественные новообразования, которые устойчивы к одному терапевтическому средству, могут реагировать на комбинированное лечение с использованием двух или более различных терапевтических средств.

Когда полипептидное терапевтическое средство по настоящему изобретению вводят в комбинации с другим общепринятым антинеопластическим средством, параллельно или последовательно, можно наблюдать, что такое терапевтическое средство усиливает терапевтическое действие антинеопластического средства или обеспечивает преодоление устойчивости клеток к такому антинеопластическому средству. Это позволяет снижать дозу антинеопластического средства, таким образом, снижая нежелательные побочные эффекты или восстанавливая эффективность антинеопластического средства в устойчивых клетках.

Фармацевтические соединения, которые можно использовать для комбинированной противоопухолевой терапии, включают, только в качестве иллюстрации: аминоглутетимид, амсакрин, анастрозол, аспарагиназу, bsg, бикалутамид, блеомицин, бусерелин, бусульфид, камптотецин, капецитабин, карбоплатин, кармустин, хлорамбуцил, цисплатин, кладрибин, клодронат, колхицин, циклофосфамид, ципротерон, цитарабин, дакарбазин, дактиномицин, даунорубин, диенэстрол, диэтилстильбэстрол, доцетаксел,

доксорубицин, эпирубицин, эстрадиол, эстрамустин, этопозид, экземестан, филграстим, флударабин, флудрокортисон, фторурацил, флуоксиместерон, флутамид, гемцитабин, генистеин, гозерелин, гидроксимочевину, идарубицин, ифосфамид, иматиниб, интерферон, иринотекан, иронотекан, летрозол, лейковорин, лейпролид, левамизол, ломустин, мехлоретамин, медроксипрогестерон, мегестрол, мелфалан, меркаптопурин, месну, метотрексат, митомицин, митотан, митоксантрон, нилутамид, нокодазол, октреотид, оксалиплатин, паклитаксел, памидронат, пентостатин, пликамицин, порфирин, прокарбазин, ралтитрексед, ритуксимаб, стрептозоцин, сурамин, тамоксифен, темозоломид, тенипозид, тестостерон, тиогуанин, тиотепу, дихлорид титаноцена, топотекан, трастузумаб, третиноин, винбластин, винкристин, виндезин и винорелбин.

Определенные химиотерапевтические противоопухолевые соединения по их механизму действия можно классифицировать, например, на следующие группы: антиметаболиты/средства против злокачественных опухолей, такие как аналоги пиримидина (5-фторурацил, флоксурин, капецитабин, гемцитабин и цитарабин) и аналоги пурина, антагонисты фолатов и родственные ингибиторы (меркаптопурин, тиогуанин, пентостатин и 2-хлордезоксиаденозин (кладрибин)); антипролиферативные/антимитотические средства, включающие природные продукты, такие как алкалоиды барвинка (винбластин, винкристин и винорелбин), разрушающие микротрубочки средства, такие как таксан (паклитаксел, доцетаксел), винкристин, винбластин, нокодазол, эпотилоны и навельбин, эпидиподофиллотоксины (этопозид, тенипозид), повреждающие ДНК средства (актиномицин, амсакрин, антрациклины, блеомицин, бусульфид, камптотecin, карбоплатин, хлорамбуцил, цисплатин, циклофосфамид, цитоксан, дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, гексаметилмеламиноксалиплатин, ифосфамид, мелфалан, мерхлоретамин, митомицин, митоксантрон, нитрозомочевина, пликамицин, прокарбазин, таксол, таксотер, тенипозид, триэтилентрифосфоридамид и этопозид (VP16)); антибиотики, такие как дактиномицин (актиномицин D), даунорубицин, доксорубицин (адриамицин), идарубицин, антрациклины, митоксантрон, блеомицины, пликамицин (митрамицин) и митомицин; ферменты (L-аспарагиназа, которая системно метаболизирует L-аспарагин и обедняет клетки, не способные синтезировать свой собственный аспарагин); антитромбоцитарные средства; антипролиферативные/антимитотические алкилирующие средства, такие как азотистые иприты (мехлоретамин, циклофосфамид и аналоги, мелфалан, хлорамбуцил), этиленимины и метилмеламины (гексаметилмеламин и тиотепу), алкилсульфонаты-бусульфид, разновидности нитрозомочевин (кармустин (BCNU) и аналоги, стрептозоцин), тразены-дакарбазин (DTIC); антипролиферативные/антимитотические антиметаболиты, такие как аналоги фолиевой кислоты (метотрексат); координационные комплексы платины (цисплатин, карбоплатин), прокарбазин, гидроксимочевина, митотан, аминоглютетимид; гормоны, аналоги гормонов (эстроген, тамоксифен, гозерелин, бикалутамид, нилутамид) и ингибиторы ароматазы (летрозол, анастрозол); антикоагулянты (гепарин, синтетические соли гепарина и другие ингибиторы тромбина); фибринолитические средства (такие как тканевой активатор плазминогена, стрептокиназа и урокиназа), аспирин, дипиридамол, тиклопидин, клопидогрел, абиксимаб; антимиграционные средства; антисекреторные средства (бевелдин); иммунодепрессанты (циклопорин, такролимус (FK-506), сиролимус (рапамицин), азатиоприн, микофенолат мофетил); антиангиогенные соединения (TNP-470, генистеин) и ингибиторы факторов роста (например, ингибиторы VEGF, ингибиторы фактора роста фибробластов (FGF)); блокаторы рецепторов ангиотензина; доноры оксида азота (II); антисмысловые олигонуклеотиды; антитела (трастузумаб); ингибиторы клеточного цикла и индукторы дифференцировки (третиноин); ингибиторы mTOR, ингибиторы топоизомераз (доксорубицин (адриамицин), амсакрин, камптотecin, даунорубицин, дактиномицин, энипозид, эпирубицин, этопозид, идарубицин и митоксантрон, топотекан, иринотекан), кортикостероиды (кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизон и пренизолон); ингибиторы сигнальных киназ факторов роста; индукторы дисфункции митохондрий и активаторы каспаз; и разрушающие хроматин средства.

В зависимости от характера комбинированного лечения введение антитела к PD-L1 по изобретению (или его фрагмента) можно продолжать, пока вводят другое терапевтическое средство и/или после этого. Введение полипептидных терапевтических средств можно проводить в виде однократной дозы или в виде нескольких доз. В некоторых случаях введение полипептидных терапевтических средств начинают, по меньшей мере, за несколько суток до общепринятого терапевтического средства, тогда как в других случаях введение начинают или непосредственно до или во время введения общепринятого терапевтического средства.

В одном из примеров диагностического применения биологический образец, такой как сыворотка или тканевой биоптат, получаемый у пациента, у которого подозревают наличие патологического состояния, характеризуемого неадекватным ангиогенезом, приводят в контакт с меченным детектируемой меткой полипептидом по изобретению с выявлением уровней PD-L1. Затем выявленные уровни PD-L1 сравнивают с уровнями PD-L1, выявляемыми в нормальном образце, также приводимом в контакт с меченым полипептидом. Увеличение уровней PD-L1 по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% можно рассматривать как диагностический показатель.

В некоторых вариантах осуществления связывающие PD-L1 полипептиды дополнительно связывают с детектируемой меткой (например, метка может представлять собой радиоактивный изотоп, флуоресцентное соединение, фермент или кофактор фермента). Активная молекула может представлять собой

радиоактивное средство, такое как радиоактивные тяжелые металлы, такие как хелаты железа, радиоактивные хелаты гадолиния или марганца, излучатели позитронов, выбранные из кислорода, азота, железа, углерода или галлия,  $^{43}\text{K}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{132}\text{I}$  или  $^{99}\text{Tc}$ . Связывающее средство, связанное с такой молекулой, можно использовать в качестве визуализирующего средства, и его вводят в количестве, эффективном для диагностического применения у млекопитающего, такого как человек, и затем детектируют локализацию и накопление визуализирующего средства. Локализацию и накопление визуализирующего средства можно детектировать посредством радиосцинтиграфии, визуализации ядерного магнитного резонанса, компьютерной томографии или позитронно-эмиссионной томографии. Иммуносцинтиграфию с использованием связывающих PD-L1 полипептидов, направленных на PD-L1, можно использовать для детекции и/или диагностики злокачественные опухоли и сосудистой системы. Например, для такой визуализации можно эффективно использовать любой связывающий маркер PD-L1 полипептид, меченный  $^{99}\text{Tc}$  технецием,  $^{111}\text{In}$  индием или  $^{125}\text{I}$  йодом. Как понятно специалисту в данной области, количество вводимого радиоактивного изотопа зависит от радиоактивного изотопа. Специалисты в данной области могут легко сформулировать количество вводимого визуализирующего средства в зависимости от удельной активности и энергии конкретного радионуклида, используемого в качестве активной молекулы. Как правило, вводят 0,1-100 мКи (милликури) на дозу визуализирующего средства, предпочтительно 1-10 мКи, наиболее часто 2-5 мКи. Таким образом, композиции по настоящему изобретению, пригодные в качестве визуализирующих средств, содержащих направленную молекулу, конъюгированную с радиоактивной молекулой, содержат 0,1-100 мКи, в некоторых вариантах осуществления предпочтительно 1-10 мКи, в некоторых вариантах осуществления предпочтительно 2-5 мКи, в некоторых вариантах осуществления более предпочтительно 1-5 мКи.

Антитело против PD-L1 по изобретению (или его фрагмент) также можно использовать для доставки дополнительных терапевтических средств (включая в качестве неограничивающих примеров лекарственные соединения, химиотерапевтические соединения и радиотерапевтические соединения) в клетку или ткань, экспрессирующие PD-L1. В одном из примеров антитело против PD-L1 по изобретению (или его фрагмент) сливают с химиотерапевтическим средством для направленной доставки химиотерапевтического средства в опухолевую клетку или ткань, экспрессирующие PD-L1.

Антитело против PD-L1 по изобретению (или его фрагмент) можно использовать в ряде применений, включая исследовательские, диагностические и терапевтические применения. Например, их можно использовать для выделения и/или очистки рецептора или его частей и для исследования структуры (например, конформации) и функции рецептора.

В некоторых аспектах различные связывающие полипептиды можно использовать для детекции или количественного определения экспрессии PD-L1, например, на эндотелиальных клетках (например, венозных эндотелиальных клетках) или на клетках, трансфицированных геном PD-L1. Таким образом, они также пригодны в таких применениях, как сортировка и визуализация клеток (например, проточная цитометрия и сортировка флуоресцентно-активированных клеток) для диагностических или исследовательских целей.

В некоторых вариантах осуществления связывающие полипептиды или их фрагменты можно метить или не метить для диагностических целей. Как правило, диагностические анализы включают детекцию формирования комплекса в результате связывания связывающего полипептида с PD-L1. Связывающие полипептиды или фрагменты можно непосредственно метить подобно антителам. Можно использовать различные метки, включая в качестве неограничивающих примеров радионуклиды, флуорофоры, ферменты, субстраты ферментов, кофакторы ферментов, ингибиторы и лиганды ферментов (например, биотин, гаптены). Специалистам в данной области известно множество подходящих иммунологических анализов (патенты США 3817827; 3850752; 3901654 и 4098876). При отсутствии метки связывающие полипептиды можно использовать в таких анализах, как анализы агглютинации. Немеченные связывающие полипептиды также можно использовать в комбинации с другим (одним или несколькими) подходящим реагентом, который можно использовать для детекции связывающего полипептида, таким как меченое антитело, реакционноспособное со связывающим полипептидом, или другим подходящим реагентом (например, меченым белком А).

В одном из вариантов осуществления связывающие полипептиды по настоящему изобретению можно использовать в иммуноферментных анализах, где рассматриваемые полипептиды конъюгированы с ферментом. Когда биологический образец, содержащий белок PD-L1, комбинируют с рассматриваемыми связывающими полипептидами, происходит связывание связывающих полипептидов и белка PD-L1. В одном из вариантов осуществления образец, содержащий клетки, экспрессирующие белок PD-L1 (например, клетки эндотелия) комбинируют с рассматриваемыми антителами, и происходит связывание связывающих полипептидов и клеток, несущих белок PD-L1, распознаваемый связывающим полипептидом. Эти связанные клетки можно отделять от несвязанных реагентов и можно определять присутствие конъюгата связывающего полипептида и фермента, специфически связанного с клетками, например посредством приведения образца в контакт с субстратом фермента, который под действием фермента продуцирует окраску или другое детектируемое изменение. В другом варианте осуществления рассматриваемые связывающие полипептиды можно не метить, а можно добавлять второй меченый полипептид

(например, антитело), который распознает рассматриваемый связывающий полипептид.

В некоторых аспектах также можно получать наборы для использования при детекции присутствия белка PD-L1 в биологическом образце. Такие наборы содержат связывающий PD-L1 полипептид, который связывается с белком PD-L1 или частью указанного рецептора, а также один или несколько вспомогательных реагентов, подходящих для детекции присутствия комплекса связывающего полипептида и рецепторного белка или его частей. Полипептидные композиции по настоящему изобретению можно предоставлять в лиофилизированной форме, отдельно или в комбинации с дополнительными антителами, специфичными к другим эпитопам. Связывающие полипептиды и/или антитела, которые могут быть мечеными или немечеными, можно включать в наборы со вспомогательными ингредиентами (например, буферами, такими как Tris, фосфат и карбонат, стабилизаторами, эксципиентами, биоцидами и/или инертными белками, например бычьим сывороточным альбумином). Например, связывающие полипептиды и/или антитела можно предоставлять в виде лиофилизированной смеси со вспомогательными ингредиентами, или вспомогательные ингредиенты можно предоставлять отдельно для комбинирования пользователем. Как правило, эти вспомогательные материалы составляют менее чем приблизительно 5% массы на основе количества активного связывающего полипептида или антитела и как правило присутствуют в общем количестве по меньшей мере приблизительно 0,001 мас.% на основе концентрации полипептида или антитела. Когда используют второе антитело, способное к связыванию со связывающим полипептидом, такое антитело можно предоставлять в наборе, например в отдельном флаконе или контейнере. Второе антитело, если оно присутствует, как правило, является меченым, и его можно формулировать аналогично составам антител, описанным выше.

Подобным образом, по настоящему изобретению также предусмотрен способ детекции и/или количественного определения экспрессии PD-L1, где композицию, содержащую клетки или фракцию (например, мембранную фракцию), приводят в контакт со связывающим полипептидом, который связывается с PD-L1 или частью рецептора в условиях, подходящих для связывания с ним, и осуществляют мониторинг связывания. Детекция связывающего полипептида, свидетельствующая о формировании комплекса связывающего полипептида и PD-L1 или его части, указывает на присутствие рецептора. Связывание полипептида с клеткой можно определять стандартными способами, такими как способы, описанные в демонстрационных примерах. Способ можно использовать для детекции экспрессии PD-L1 на клетках индивидуума. Необязательно можно оценивать количественную экспрессию PD-L1 на поверхности клеток эндотелия, например посредством проточной цитометрии, и интенсивность окрашивания может коррелировать с наличием, прогрессированием или риском заболевания.

По настоящему изобретению также предусмотрен способ детекции наличия у млекопитающего определенных заболеваний. В качестве иллюстрации способ можно использовать для детекции наличия у млекопитающего прогрессирующих заболеваний на основе количества PD-L1, присутствующего на клетках, и/или количества положительных по PD-L1 клеток у млекопитающего.

Полипептидные последовательности указаны с использованием стандартных одно- или трехбуквенных сокращений. Если не указано иное, N-конец каждой полипептидной последовательности находится слева, а C-конец справа; 5'-конец каждой одноцепочечной последовательности нуклеиновой кислоты и верхней цепи каждой двухцепочечной последовательности нуклеиновой кислоты находится слева, а 3'-конец справа. Конкретную полипептидную последовательность также может быть описана посредством объяснения того, чем она отличается от эталонной последовательности.

Антигенсвязывающие белки, направленные к PD-L1, можно использовать, например, в анализах для детекции присутствия полипептидов PD-L1 *in vitro* или *in vivo*. Антигенсвязывающие белки также можно использовать при очистке белков PD-L1 посредством иммуноаффинной хроматографии. Блокирующие антигенсвязывающие белки можно использовать в способах, описанных в настоящем документе. Такие антигенсвязывающие белки, функционирующие в качестве антагонистов PD-L1, можно использовать при лечении любого индуцированного PD-L1 состояния, включая в качестве неограничивающих примеров различные злокачественные опухоли.

Антигенсвязывающие белки можно использовать в способе *in vitro* или вводить *in vivo* с ингибированием индуцированной PD-L1 биологической активности. Таким образом, можно лечить нарушения, вызываемые или усиливаемые (непосредственно или опосредованно) вследствие протеолитической активности PD-L1, примеры которых предоставлены в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления по настоящему изобретению предусмотрен терапевтический способ, включающий введение блокирующего PD-L1 антигенсвязывающего белка нуждающемуся в этом млекопитающему *in vivo* в количестве, эффективном для уменьшения индуцированной PD-L1 биологической активности.

Фармацевтические составы описываемых антител с противоопухолевыми вакцинами.

Комбинированный терапевтический продукт или состав описываемого антитела к PD-L1 с терапевтической вакциной обеспечивает синергическое противоонкологическое терапевтическое действие. Например, настоящее изобретение относится к комбинации раскрытого антитела к PD-L1 с "Neuvax", который представляет собой 9-членный синтетический пептид, полученный из E75, выделяемый из HER2/neu в комбинации с GM-CSF в качестве адъюванта, как описано в патенте США 8222214, описание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки. Кроме того, настоящее изобретение относится к ком-



бинации описываемого антитела к PD-L1 с вакциной ALVAC-CEA, которая представляет собой поксвирус канареек в комбинации с раково-эмбриональным антигеном.

Получение антигенсвязывающих белков против PD-L1.

Антигенсвязывающие белки можно получать любым из ряда общепринятых способов. В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, которые связываются с PD-L1. Например, моноклональные антитела можно выделять из клеток, которые экспрессируют их в естественных условиях (например, антитело можно выделять из продуцирующей его гибридомы), или получать в рекомбинантных экспрессирующих системах, любым известным в данной области способом. См., например, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet et al. (ред.), Plenum Press, New York (1980); и *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (ред.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988).

Моноклональные антитела можно получать любым способом, известным в данной области, например, посредством иммортализации клеток селезенки, полученных у трансгенного животного после завершения протокола иммунизации. Клетки селезенки можно иммортализовать любым способом, известным в данной области, например посредством их слияния с миеломными клетками с получением гибридом. Миеломные клетки для использования в способах слияния с получением гибридом предпочтительно не продуцируют антитела, обладают высокой эффективностью слияния и у них существует недостаточность ферментов, что делает их неспособными расти на некоторых селективных средах, которые поддерживают рост только требуемых слитых клеток (гибридом). Примеры подходящих линий клеток для использования в слияниях у мышей включают Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag41, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 и S194/5XX0 Bul; примеры линий клеток, используемых в слияниях у крыс включают R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F и 48210. Другие линии клеток, пригодные для слияния клеток, представляют собой U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 и UC729-6.

В одном из примеров полипептиды получают способами рекомбинантных ДНК посредством вставки последовательности нуклеиновой кислоты (например, кДНК), кодирующей полипептид, в рекомбинантный экспрессирующий вектор и экспрессии последовательность ДНК в условиях, способствующих экспрессии.

Для рекомбинантной продукции антитела к PD-L1 выделяют нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, и встраивают в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такую нуклеиновую кислоту можно легко выделять и секвенировать общепринятыми способами (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, способными специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела).

Нуклеиновые кислоты, кодирующие любое из антител к PD-L1 (или фрагменты), описываемых в настоящем описании, можно синтезировать химически. Использование кодонов можно выбирать так, чтобы улучшить экспрессию в клетке. Такое использование кодонов зависит от выбранного типа клеток. Для *E.coli* и других бактерий, а также клеток млекопитающих, клеток растений, клеток дрожжей и клеток насекомых, разработаны специализированные профили использования кодонов. См., например, Mayfield et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003 100(2):438-42; Sinclair et al. *Protein Expr. Purif.* 2002 (1):96-105; Connell N D. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001 12(5):446-9; Makrides et al. *Microbiol. Rev.* 1996 60(3):512-38 и Sharp et al. *Yeasts*. 1991 7(7):657-78.

Основные способы обработки нуклеиновых кислот описаны, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, тома 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2-е изд., 1989 или F. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing и Wiley-Interscience: New York, 1987) и периодических обновлениях, включенных в настоящее описание в качестве ссылки. Кодированная полипептид ДНК функционально связана с подходящими транскрипционными или трансляционными регуляторными элементами, получаемыми из генов млекопитающих, вирусов или насекомых. Такие регуляторные элементы включают транскрипционный промотор, необязательную операторную последовательность для контроля транскрипции, последовательность, кодирующую подходящие участки связывания рибосомы в иРНК, и последовательности, которые контролируют терминацию транскрипции и трансляции. Дополнительно добавлена возможность репликации в хозяине, которую, как правило, обеспечивает участок начала репликации, и встроены селективный ген для облегчения распознавания трансформантов.

Также рекомбинантная ДНК может содержать последовательность белковой метки любого типа, которую можно использовать для очистки белка. Примеры белковых меток включают, но не ограничиваются ими, гистициновую метку, метку FLAG, метку пус, метку HA или метку GST. Подходящие клонирующие и экспрессирующие векторы для использования с клетками-хозяевами бактерий, грибов, дрожжей и млекопитающих можно найти в *Cloning Vectors: A Laboratory Manual* (Elsevier, N.Y., 1985).

Экспрессирующую конструкцию вводят в клетку-хозяина способом, подходящим для клетки-хозяина. В данной области известно множество способов введения нуклеиновых кислот в клетки-хозяева, включая в качестве неограничивающих примеров электропорацию; трансфекцию с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ; бомбардировку микрочастицами; липофекцию и инфекцию (где вектор является инфекционным агентом). Подходящие клетки-хозяева включают прокариот, дрожжей, клетки млекопитающих или бактериальные



клетки, как более подробно описано далее.

Для получения рекомбинантных полипептидов (например, рекомбинантного антитела) по изобретению можно использовать любую экспрессирующую систему, известную в данной области. Как правило, клетки-хозяева трансформируют рекомбинантным экспрессирующим вектором, который содержит ДНК, кодирующую требуемый полипептид. В числе клеток-хозяев, которые можно использовать, находятся прокариоты, дрожжи или клетки высших эукариот. Прокариоты включают граммотрицательные или грамположительные организмы, например *E.coli* или бациллы. Клетки высших эукариот включают клетки насекомых и широко известные линии клеток, полученные у млекопитающих. Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, включают прокариотические или эукариотические клетки, описываемые в настоящем документе. Например, антитела можно получать в бактериях, в частности, когда нет необходимости в гликозилировании и эффекторной функции Fc. Об экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., например, патенты США NO: 5648237, 5789199 и 5840523. (Также см. Charlton, *Methods in Molecular Biology*, том 248 (B.K.C. Lo, ред., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), стр. 245-254, где описана экспрессия фрагментов антител в *E.coli*.) После экспрессии антитело можно выделять из бактериальной клеточной массы в растворимой фракции и можно дополнительно очищать. Клетки высших эукариот включают клетки насекомых и широко известные линии клеток, полученные у млекопитающих. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают линию клеток почки обезьяны COS-7 (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, *Cell* 23:175), клетки L, клетки 293, клетки C127, клетки 3T3 (ATCC CCL 163), клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки HeLa, линии клеток BHK (ATCC CRL 10 и линию клеток CV1/EBNA, полученную из линии клеток почки африканской зеленой мартышки CV1 (ATCC CCL 70), как описано в McMahan et al., 1991, *EMBO J.* 10: 2821. Подходящие клонирующие и экспрессирующие векторы для использования с клетками-хозяевами бактерий, грибов, дрожжей и млекопитающих описаны в Pouwels et al. (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y., 1985).

В некоторых вариантах осуществления для экспрессии антитела к PD-L1 или его фрагмента в качестве хозяев можно использовать клетки позвоночных. Например, пригодными могут являться линии клеток млекопитающих, адаптированные к росту в суспензии. Другими примерами пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия почки обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7); линия эмбриональной почки человека (293 или клетки 293, как описано, например, в Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59(1977)); клетки почки детеныша хомяка (BHK); клетки Сертоли мыши (клетки TM4, как описано, например, в Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени крысы Buffalo (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, как описано, например, в Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); клетки MRC 5 и клетки FS4. Другие пригодные линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), включая клетки CHO DHFR (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)) и линии миеломных клеток, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для получения антител, см., например, в Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, том 248 (B.K.C. Lo, ред., Humana Press, Totowa, N.J.), стр. 255-268 (2003). Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают линию клеток почки обезьяны COS-7 (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, *Cell* 23:175), клетки L, клетки 293, клетки C127, клетки 3T3 (ATCC CCL 163), клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки HeLa, линии клеток BHK (ATCC CRL 10) и линию клеток CV1/EBNA, полученную из линии клеток почки африканской зеленой мартышки CV1 (ATCC CCL 70), как описано в McMahan et al., 1991, *EMBO J.* 10: 2 821.

В дополнение к прокариотам подходящими клонирующими или экспрессирующими хозяевами для кодирующих антитела векторов являются эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей с "гуманизированными" путями гликозилирования, что приводит к получению антител с частично или полностью человеческим профилем гликозилирования. См. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) и Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антитела также получают из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Идентифицировано множество штаммов бакуловирусов, которые можно использовать в сочетании с клетками насекомого, в частности для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Соответствующие клонирующие и экспрессирующие векторы для использования с клетками-хозяевами бактерий, грибов, дрожжей и млекопитающих описаны в Pouwels et al. (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y., 1985).

Трансформированные клетки можно культивировать в условиях, которые обеспечивают экспрессию полипептида, а полипептид можно восстанавливать общепринятыми способами очистки белка. Один из таких способов очистки включает использование аффинной хроматографии, например, в матриксе, содержащем связанный с ним полноразмерный PD-L1 или его часть (например, внеклеточный

домен). Полипептиды, предусмотренные для применения по настоящему описанию, включают по существу гомогенные полипептиды рекомбинантных антител млекопитающих к PD-L1, по существу не содержащие загрязняющие эндогенные материалы.

Таким образом, антитела можно получать рекомбинантными способами и с использованием композиций, например, как описано в патенте США № 4816567. По одному из вариантов осуществления предоставлена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против PD-L1, описанное в настоящем документе. Такая нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую  $V_L$  и/или аминокислотную последовательность, содержащую  $V_H$  антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи антитела). В дополнительном варианте осуществления предусмотрен один или несколько векторов (например, экспрессирующих векторов), которые содержат такую нуклеиновую кислоту. По дополнительному варианту осуществления предоставлена клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В одном из таких вариантов осуществления клетка-хозяин содержит (например, трансформирована): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую  $V_L$  антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую  $V_H$  антитела, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую  $V_L$  антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую  $V_H$  антитела. В одном из вариантов осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например клеткой яичника китайского хомяка (CHO) или лимфоидной клеткой (например, клеткой Y0, NS0, Sp20). В одном из вариантов осуществления предоставлен способ получения антитела к PD-L1, где способ включает культивирование клеток-хозяев, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, как указано выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и, необязательно, выделение антитела из клетки-хозяина (или среды для культивирования клеток-хозяев).

Описываемые в настоящем документе белки также можно получать с использованием систем трансляции клетки. Для таких целей нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид, нужно модифицировать для обеспечения транскрипции *in vitro* с получением иРНК и обеспечения бесклеточной трансляции иРНК в конкретной используемой бесклеточной системе (эукариотической, такой как бесклеточная система трансляции млекопитающего или дрожжей, или прокариотической, такой как бактериальная бесклеточная система трансляции).

Связывающие PD-L1 полипептиды также можно получать посредством химического синтеза (например, способами, описанными в Solid Phase Peptide Synthesis, 2-е изд., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill). Модификации белка также можно получать посредством химического синтеза.

Полипептиды по настоящему раскрытию можно очищать способами выделения/очистки белков, общеизвестных в области химии белков. Неограничивающие примеры включают экстракцию, перекристаллизацию, высаливание (например, с сульфатом аммония или сульфатом натрия), центрифугирование, диализ, ультрафильтрацию, адсорбционную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, хроматографию с нормальными фазами, хроматографию с обращенными фазами, гель-фильтрацию, гельпроникающую хроматографию, аффинную хроматографию, электрофорез, противоточное распределение или любые их комбинации. После очистки в полипептидах можно проводить замену на другие буферы и/или концентрирование любым из множества способов, известных в данной области, включая в качестве неограничивающих примеров фильтрацию и диализ.

Очищенный полипептид предпочтительно является по меньшей мере на 85% чистым, более предпочтительно по меньшей мере на 95% чистым и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 98% чистым. Вне зависимости от точного числового значения чистоты полипептид является достаточно чистым для применения в качестве фармацевтического препарата. Антигенсвязывающие белки (например, антитела, фрагменты антител, производные антител, мутеины антител и варианты антител) представляют собой полипептиды, которые связываются с PD-L1, (предпочтительно PD-L1 человека). Антигенсвязывающие белки включают антигенсвязывающие белки, которые ингибируют биологическую активность PD-L1.

Антигенсвязывающие белки можно получать и подвергать скринингу на требуемые свойства любым из множества известных способов. Некоторые из способов включают выделение нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидную цепь (или ее часть) представляющего интерес антигенсвязывающего белка (например, антитела к PD-L1), и обработку нуклеиновой кислотой посредством технологий рекомбинантных ДНК. Нуклеиновую кислоту можно сливать с другой представляющей интерес нуклеиновой кислотой или изменять (например, посредством мутагенеза или других общепринятых способов), например, добавляя, удаляя или заменяя один или несколько аминокислотных остатков.

Одноцепочечные антитела можно формировать, связывая фрагменты переменных доменов тяжелой и легкой цепей (Fv-области) посредством аминокислотного мостика (короткого пептидного линкера), получая в результате единую полипептидную цепь. Такие одноцепочечные Fv (scFv) получали посредством слияния ДНК, кодирующей пептидный линкер, между ДНК, кодирующих два полипептида переменных доменов ( $V_L$  и  $V_H$ ). Получаемые полипептиды могут образовывать обратную укладку на самих себя с формированием антигенсвязывающих мономеров, или они могут формировать мультимеры (например, димеры, тримеры или тетрамеры) в зависимости от длины гибкого линкера между двумя ва-

риабельными доменами (Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108). Комбинируя различные полипептиды, содержащие  $V_L$  и  $V_H$ , можно формировать мультимерные scFv, которые связываются с различными эпитопами (Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40). Способы, разработанные для получения одноцепочечных антител, включают способы, описанные в патенте США 4946778; Bird, 1988, Science 242:423; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879; Ward et al., 1989, Nature 334:544, de Graaf et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178:379-87.

Известны способы получения антител отличающегося от представляющего интерес антитела подкласса или изотипа, т.е. переключения подкласса. Таким образом, можно получать, например, антитела IgG из антитела IgM и наоборот. Такие способы позволяют получать новые антитела, которые обладают антигенсвязывающими свойствами заданного антитела (исходного антитела), но также проявляют биологические свойства, ассоциированные с изотипом или подклассом антитела, отличающимся от изотипа или подкласса исходного антитела. Можно использовать технологии рекомбинантных ДНК. В таких способах можно использовать клонированную ДНК, кодирующую конкретные полипептиды антител, например ДНК, кодирующую константный домен антитела требуемого изотипа (Lantto et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178:303-16). Кроме того, если необходим IgG4, также желательным может являться внесение точечной мутации (CPSCP->CPPCP) в шарнирную область (Bloom et al., 1997, Protein Science 6:407), для уменьшения тенденции формирования дисульфидных связей внутри цепи H, что может приводить к гетерогенности антител IgG4.

Другие варианты осуществления описаны в приводимых ниже неограничивающих примерах.

Пример 1. Сравнительная аффинность антитела H6B1L и вариантов антитела.

В данном примере приведены данные Bicasge, демонстрирующие, что три полностью человеческих антитела, дикий тип (H6B1L), H6B1L-EV и H6B1L-EM обладают сходной друг с другом аффинностью к PD-L1 человека, как представлено в таблице ниже.

Сравнительные данные BIACORE для исходного антитела H6B1L и вариантов H6B1L-EV и -EM

Название	$k_a$ (1/Mc)	$k_d$ (1/c)	$R_{max}$ (RU)	$K_A$ (1/M)	$K_D$ (M)	$\chi^2$
H6B1L	1,51E+06	2,80E-03	60,1	5,40E+08	1,85E-09	0,38
H6B1L-EV	1,57E+06	2,87E-03	57,3	5,48E+08	1,82E-09	0,496
H6B1L-EM	1,38 E6	2,14E-03	248	6,44E+08	1,55E-09	7,93

Таким образом, неожиданно, замена одной или двух аминокислот в легкой цепи привела к улучшенной возможности производства антитела в достаточных количествах, но не повлияла на связывающую способность в отношении связывания с его мишенью, PD-L1 человека.

Пример 2. Улучшенное производство антитела H6B1L-EM.

В этом примере проиллюстрирован масс-спектрометрический анализ двух легких цепей исходного антитела H6B1L дикого типа (SEQ ID NO. 4) и легкой цепи H6B1L-EM (SEQ ID NO. 2). Каждое из антител продуцировали в клетках CHO. Сравнение полученных пиков приведено на фиг. 1A. Кроме того, посредством N-концевого секвенирования по Эдману проведено подтверждение, что в пиках масс-спектров легкой цепи H6B1L дикого типа присутствуют фрагменты легкой цепи SYELMXXX и LMXXX. Как описано на фиг. 1B, в легкой цепи H6B1LEM по сравнению с исходной легкой цепью фрагментов легкой цепи (LC) не детектировали.

Таблица последовательностей

	Область домена тяжелой цепи. Остатки, приводимые курсивом, означают последовательности CDR.	Область домена легкой цепи. Изменения относительно исходной цепи H6B1L подчеркнуты. Остатки в цепи H6B1L, приводимые <b>полужирным шрифтом</b> , демонстрируют положения мутаций в цепях вариантов ЕМ и EV. Остатки, приводимые <i>курсивом</i> , означают последовательности CDR.
H6B1L-EM	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAS GGTFSSYAYSWVRQAPGQGLEWMGG IIPSFGTANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGP IVATITPLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1)	SYVLTQPPSVSVAPGKTATIACGGE NIGRKT VHWYQQKPGQAPV LVIYYD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEADYYCLVWDSSSDHRIFG GGTKLTVL (SEQ ID NO:2)
H6B1L-EV	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAS GGTFSSYAYSWVRQAPGQGLEWMGG IIPSFGTANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGP IVATITPLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1)	SYVLMQPPSVSVAPGKTATIACGGE NIGRKT VHWYQQKPGQAPV LVIYYD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEADYYCLVWDSSSDHRIFG GGTKLTVL (SEQ ID NO:3)
H6B1L	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAS GGTFSSYAYSWVRQAPGQGLEWMGG IIPSFGTANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGP IVATITPLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1)	SY <b>ELM</b> QPPSVSVAPGKTATIACGGE NIGRKT VHWYQQKPGQAPV LVIYYD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEADYYCLVWDSSSDHRIFG GGTKLTVL (SEQ ID NO:4)
CDR1 домена тяжелой цепи	SYAYS (SEQ ID NO:5)	
CDR2 домена тяжелой цепи	GIIPSFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO:6)	
CDR3 домена тяжелой цепи	GPIVATITPLDY (SEQ ID NO:7)	
CDR1 домена легкой цепи	GGENIGRKT VH (SEQ ID NO:8)	
CDR2 домена легкой цепи	YDSDRPS (SEQ ID NO:9)	
CDR3 домена легкой цепи	LVWDSSSDHRI (SEQ ID NO:10)	

Включение в качестве ссылки.

Содержание всех ссылок, патентов и патентных заявок, цитируемых на всем протяжении изобретения, таким образом явно включено в качестве ссылки.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полностью человеческое антитело класса IgG, которое связывается с эпитопом PD-L1, содержащее переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

2. Полностью человеческое антитело класса IgG, которое связывается с эпитопом PD-L1, содержащее переменный домен тяжелой цепи, содержащий домен CDR1, домен CDR2 и домен CDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7 соответственно, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

3. Полностью человеческое антитело по п.2, содержащее комбинацию аминокислотных последовательностей переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 3.

4. Полностью человеческое антитело по любому из пп.1-3, которое представляет собой IgG1 или IgG4.

5. Антитело по любому из пп.1-4, которое получают в клетке-хозяине млекопитающего.

6. Антитело по п.5, где клетка-хозяин млекопитающего представляет собой клетку яичника китайского хомяка (CHO).

7. Антитело по любому из пп.1-4, содержащее переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

8. Fab-фрагмент полностью человеческого антитела против PD-L1 с переменным доменом тяжелой цепи и переменным доменом легкой цепи, где переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и где переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

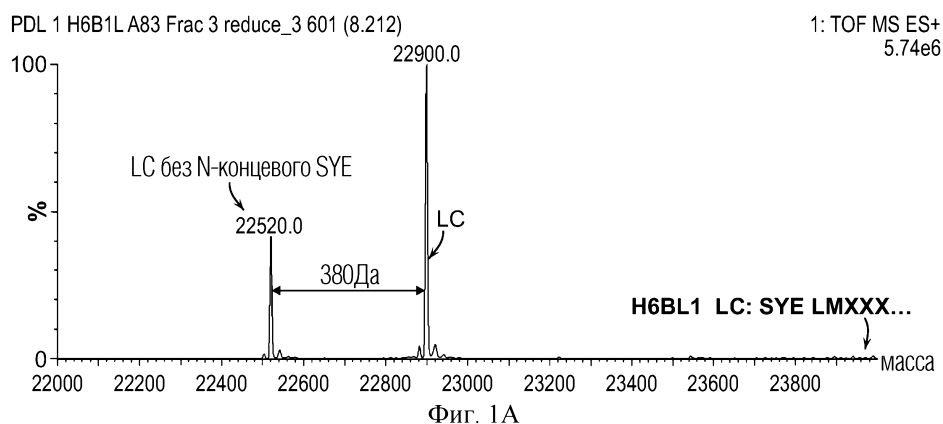
9. Fab-фрагмент полностью человеческого антитела по п.8, причем антитело содержит комбинацию аминокислотных последовательностей переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 3.

10. Fab-фрагмент полностью человеческого антитела по п.8 или 9, содержащий переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

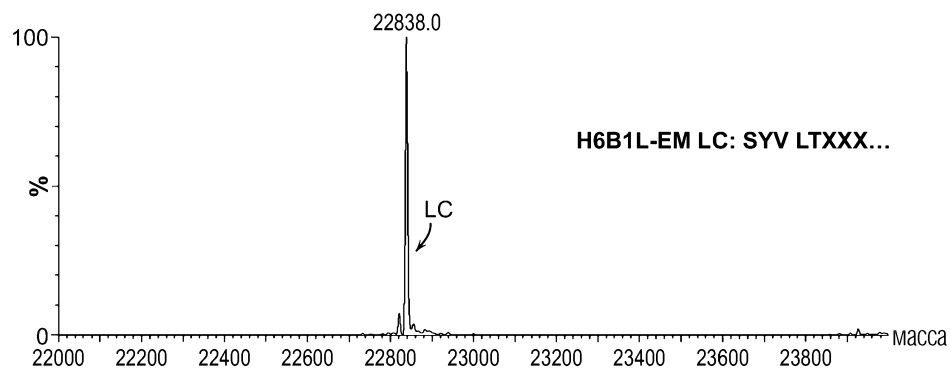
11. Одноцепочечное антитело человека к PD-L1 с переменным доменом тяжелой цепи и переменным доменом легкой цепи, связанные пептидным линкером, где переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и где переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

12. Одноцепочечное антитело по п.11, содержащее комбинацию аминокислотных последовательностей переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи SEQ ID NO:1/SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO:1/SEQ ID NO: 3.

13. Одноцепочечное антитело по п.11 или 12, содержащее переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.



00102-158-H6B1L-EM-ST



Фиг. 1В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2