



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **122478**

(13) **C2**

(51) МПК

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2016 04644	(72) Винахідник(и):	Ян Ін (US), Алаватам Сридхара (US)
(22) Дата подання заявки:	26.09.2014	(73) Володілець (володільці):	ДЖЕНЕНТЕК, ІНК., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080- 4990, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	26.11.2020	(74) Представник:	Бочаров Максим Анатолійович
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/883,953	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2013019906 A1, 07.02.2013 WO 2013093809 A1, 27.06.2013 WO 2012003470 A2, 05.01.2012 Wei Wang et al. Antibody Structure, Instability, and Formulation. Journal of pharmaceutical sciences, 2007, Vol. 96 (1), P. 1-26 WO 2013079174 A1, 06.06.2013
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	27.09.2013		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.08.2016, Бюл.№ 15		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	25.11.2020, Бюл.№ 22		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2014/057821, 26.09.2014		

(54) ВОДНА ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ, ЯКА МІСТИТЬ МОНОКЛОНАЛЬНЕ АНТИТІЛО ДО PD-L1

(57) Реферат:

Винахід стосується водної фармацевтичної композиції, яка містить моноклональне антитіло до PD-L1 у концентрації 60 мг/мл, ацетат гістидину у концентрації 20 мМ, сахарозу в концентрації 120 мМ, полісорбат 20 у концентрації 0,04% (мас./об.) і має рН 5,8, де зазначене моноклональне антитіло являє собою повнорозмірне антитіло.

UA 122478 C2

ПЕРЕХРЕСНІ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Дана заявка вимагає пріоритет на основі попередньої заявки № 61/883953, поданої 27 вересня 2013 р., повністю включеної в дану заявку за допомогою посилання.

ПОДАЧА СПИСКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ У ТЕКСТОВОМУ ФАЙЛІ ФОРМАТУ ASCII

5 Зміст наступної подачі текстового файлу ASCII повністю включений в дану заявку за допомогою посилання: машиночитана форма (CRF) Списку Послідовностей (ім'я файлу: 146392022040SEQLIST.TXT, дата запису: 26 вересня 2014, розмір: 24 Кб).

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

10 Даний винахід стосується стабільних водних фармацевтичних композицій, які містять антитіло до PD-L1.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

15 Забезпечення двох окремих сигналів до Т-клітин являє собою широко розповсюджену модель лімфоцитарної активації Т-лімфоцитів, що залишилися, антигенпрезентуючими клітинами (APC). Lafferty et al., Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 53:27-42 (1975). Дана модель додатково забезпечує розпізнавання своїх і чужих і імунну толерантність. Bretscher et al., Science, 169:1042-1049 (1970); Bretscher P.A., P.N.A.S. USA, 96:185-190 (1999); Jenkins et al., J. Exp. Med. 165:302-319 (1987). Первинний сигнал або антигенспецифічний сигнал передається через Т-клітинний рецептор (TCR) після розпізнавання чужорідного антигенного пептиду, презентованого в контексті головного комплексу гістосумісності (MHC). Другий або

20 коstimулюючий сигнал доставляється Т-клітинам за допомогою коstimулюючих молекул, експресованих на антигенпрезентуючих клітинах (APC), і індукує Т-клітини для стимулювання клональної експансії, секреції цитокінів і ефекторної функції. Lenschow et al., Ann. Rev. Immunol. 14:233 (1996). За відсутності коstimуляції Т-клітини можуть стати несприйнятливими до антигенної стимуляції, вони не викликають ефективну імунну відповідь, і далі це може

25 приводити до виснаження або до стійкості до чужорідних антигенів.

У двосигнальній моделі Т-клітини одержують обидва сигнали: як позитивний, так і негативний вторинний коstimулюючий сигнал. Регуляція таких позитивних і негативних сигналів є критичною для максимізації захисної імунної реакції хазяїна, з підтриманням при цьому імунної стійкості і запобіганням аутоімунітету. Негативні вторинні сигнали, очевидно, необхідні

30 для індукції Т-клітинної стійкості, у той час як позитивні сигнали стимулюють Т-клітинну активацію. У той час як проста двосигнальна модель усе ще забезпечує достовірне пояснення для наївних лімфоцитів, при цьому імунна реакція являє собою динамічний процес, і коstimулюючі сигнали до антигенекспонованих Т-клітин також можуть забезпечуватися. Механізм коstimуляції представляє інтерес з терапевтичної точки зору, оскільки було показано, що маніпуляції з коstimулюючими сигналами забезпечують засоби або для посилення, або для

35 термінації імунної відповіді. Нещодавно було виявлено, що Т-клітинна дисфункція або анергія з'являється одночасно з індукованою і стійкою експресією інгібуючого рецептора, поліпептиду 1 програмованої клітинної смерті (PD-1). У результаті терапевтична спрямованість PD-1 і інших молекул, що передають сигнал через взаємодії з PD-1, таких як ліганд 1 програмованої смерті (PD-L1) і ліганд 2 програмованої смерті (PD-L2), є областю інтенсивного інтересу.

40

PD-L1 надекспресується при множині злоякісних новоутворень і часто асоційований з несприятливим прогнозом (Okazaki T. et al., Intern. Immun. 2007, 19(7):813) (Thompson R.H. et al., Cancer Res 2006, 66(7):3381). Цікаво, що більшість пухлинних Т-лімфоцитів, що інфільтруються, з перевагою експресують PD-1, на відміну від Т-лімфоцитів у нормальних тканинах і в Т-лімфоцитах периферичної крові, що виявляє позитивну регуляцію PD-1 відносно пухлинореактивних Т-клітин і може сприяти зниженій імунній відповіді (Blood, 2009, 114(8):1537). Це може бути пов'язане з застосуванням сигнального шляху PD-L1, опосередкованого пухлинними клітинами, експресуючими PD-L1 і взаємодіючими з Т-клітинами, експресуючими PD-1, з підсумковим ослабленням Т-клітинної активації і відхиленням від імунного нагляду (Sharpe et al., Nat. Rev. 2002) (Keir M.E. et al., 2008, Annu. Rev. Immunol. 26:677). Таким чином, інгібування взаємодії PD-L1/PD-1 може підсилювати CD8+ Т-клітинно-опосередковане знищення пухлин.

45

Терапевтична спрямованість PD-1 і інших молекул, що передають сигнал через взаємодії з PD-1, таких як ліганд 1 програмованої смерті (PD-L1) і ліганд 2 програмованої смерті (PD-L2), є областю інтенсивного інтересу. Інгібування сигналів PD-L1 пропонувалося як засоби для посилення Т-клітинного імунітету (наприклад, протипухлинного імунітету) для лікування злоякісного новоутворення й інфекції, включаючи як гостру, так і хронічну (наприклад, стійку) інфекцію. Однак оптимальний терапевтичний засіб, спрямований на мішень по даному шляху, ще не комерціалізували, і в цьому полягає значна нереалізована потреба медицини.

50

60 Усі посилання, процитовані в даній заявці, що включають патентні заявки, патентні

публікації і реєстраційні номери UniProtKB/Swiss-Prot, включені в дану заявку повністю за допомогою посилання так, ніби кожний з цих документів був конкретно й індивідуально зазначений для включення за допомогою посилання.

СУТЬ ВИНАХОДУ

5 У даній заявці пропонуються стабільні водні фармацевтичні композиції, які містять антитіло. Композиція містить антитіло (наприклад, антитіло до PD-L1), буфер, сахарозу і поверхнево-активну речовину, де композиція має рН приблизно від 5 приблизно до 7.

В одному аспекті даної заявки пропонується стабільна водна фармацевтична композиція, яка містить моноклональне антитіло до PD-L1 у концентрації приблизно від 40 мг/мл приблизно до 125 мг/мл, ацетат гістидину або ацетат натрію в концентрації приблизно від 15 мМ приблизно до 25 мМ, сахарозу в концентрації приблизно від 60 мМ приблизно до 240 мМ, полісорбат у концентрації приблизно від 0,005% (мас./об.) приблизно до 0,06% (мас./об.) і має рН приблизно від 5 приблизно до 6,3.

15 У деяких втіленнях, моноклональне антитіло в композиції складає приблизно від 40 мг/мл приблизно до 80 мг/мл. У деяких втіленнях, моноклональне антитіло в композиції складає приблизно від 54 мг/мл приблизно до 66 мг/мл. У деяких втіленнях, моноклональне антитіло в композиції складає приблизно від 60 мг/мл. У деяких втіленнях, моноклональне антитіло в композиції складає приблизно від 60 мг/мл приблизно до 125 мг/мл. У деяких втіленнях, моноклональне антитіло в композиції складає приблизно від 125 мг/мл.

20 У деяких втіленнях, зазначений ацетат гістидину або ацетат натрію присутній у композиції в концентрації, що складає приблизно від 17 мМ приблизно до 22 мМ. У деяких втіленнях, зазначений ацетат гістидину або ацетат натрію присутній у композиції в концентрації, що складає приблизно 20 мМ.

25 У деяких втіленнях, зазначена сахароза в композиції складає приблизно від 60 мМ приблизно до 180 мМ. У деяких втіленнях, зазначена сахароза в композиції складає приблизно 120 мМ. У деяких втіленнях, зазначена сахароза в композиції складає приблизно 240 мМ.

У деяких втіленнях, композиція має рН приблизно від 5,5 приблизно до 6,1. У деяких втіленнях, композиція має рН приблизно від 5,5 приблизно до 5,8.

30 У деяких втіленнях, зазначений полісорбат у композиції являє собою полісорбат 20. У деяких втіленнях, зазначений полісорбат (наприклад, полісорбат 20) у композиції складає приблизно від 0,02% приблизно до 0,04%.

35 У деяких втіленнях, зазначене моноклональне антитіло складає в композиції приблизно 60 мг/мл, сахароза складає приблизно 120 мМ і рН композиції складає приблизно 5,8. У деяких втіленнях, зазначене моноклональне антитіло складає в композиції приблизно 125 мг/мл, сахароза складає приблизно 240 мМ і рН композиції складає приблизно 5,5.

У деяких втіленнях, композиція містить моноклональне антитіло (наприклад, антитіло до PD-L1, описане в даній заявці) у кількості приблизно 60 мг/мл, ацетат гістидину в концентрації приблизно 20 мМ, сахарозу в концентрації приблизно 120 мМ і полісорбат, що являє собою полісорбат 20, у концентрації 0,04% (мас./об.) і має рН приблизно 5,8.

40 У деяких втіленнях, композиція містить моноклональне антитіло в кількості приблизно 125 мг/мл, ацетат гістидину в концентрації приблизно 20 мМ, сахарозу в концентрації приблизно 240 мМ і полісорбат, що являє собою полісорбат 20, у концентрації 0,02% (мас./об.) і композиція має рН приблизно 5,5.

45 У деяких втіленнях, зазначене моноклональне антитіло в композиції не піддається попередній ліофілізації. У деяких втіленнях, зазначене моноклональне антитіло в композиції являє собою повнорозмірне антитіло. У деяких втіленнях, моноклональне антитіло в композиції являє собою антитіло IgG1. У деяких втіленнях, зазначене моноклональне антитіло в композиції являє собою гуманізоване антитіло. У деяких втіленнях, моноклональне антитіло в композиції являє собою фрагмент антитіла, що містить антигензв'язувальну ділянку. У деяких втіленнях, фрагмент антитіла являє собою фрагмент Fab або F(ab')₂.

У деяких втіленнях, зазначене моноклональне антитіло в композиції містить

(а) варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить:

(1) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:1);

(2) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SASFLYS (SEQ ID NO:2);

55 (3) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність QQYLYHPAT (SEQ ID NO:3); і

(b) варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить:

(1) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:4);

(2) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:5);

60 (3) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність RHWPGGFDY (SEQ ID NO:6).

У деяких втіленнях, зазначене моноклональне антитіло в композиції містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:7, і варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8. У деяких втіленнях, зазначене моноклональне антитіло в композиції містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має щонайменше 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичності послідовності з варіабельною ділянкою легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:7, і варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має щонайменше 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичності з варіабельною ділянкою важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8. У деяких втіленнях, зазначене моноклональне антитіло в композиції містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:7, і варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:32. У деяких втіленнях, зазначене моноклональне антитіло в композиції містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має щонайменше 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичності послідовності з варіабельною ділянкою легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:7, і варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має щонайменше 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичності з варіабельною ділянкою важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:32. У деяких втіленнях, зазначене моноклональне антитіло в композиції містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:9, і важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10. У деяких втіленнях, зазначене моноклональне антитіло в композиції містить легкий ланцюг, що має щонайменше 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичності послідовності з легким ланцюгом, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:9, і важкий ланцюг, що має щонайменше 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичності з важким ланцюгом, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10.

У деяких втіленнях, композицію, яка містить антитіло, зберігають у скляному флаконі або в контейнері з металевого сплаву. У деяких втіленнях, металевий сплав являє собою нержавіючу сталь 316L або сплав "Хастеллой". У деяких втіленнях, композиція стабільна при 2-8 °C протягом щонайменше 6 місяців, щонайменше 12 місяців, щонайменше 18 місяців або щонайменше 24 місяців. У деяких втіленнях, антитіло в композиції зберігає після зберігання щонайменше приблизно 75%, щонайменше приблизно 80%, щонайменше приблизно 85%, щонайменше приблизно 90% від біологічної активності до зберігання. У деяких втіленнях, біологічну активність вимірюють шляхом зв'язування антитіла з PD-L1.

У деяких втіленнях, композиція, описана в даній заявці, є стерильною. У деяких втіленнях, композиція, описана в даній заявці, придатна для введення об'єкту. У деяких втіленнях, композиція, описана в даній заявці, призначена для внутрішньовенного (IV) введення.

В іншому аспекті в даній заявці пропонується готовий виріб або набір, який містить контейнер, що містить будь-яку зі стабільних водних композицій, описаних у даній заявці. У деяких втіленнях, контейнер являє собою скляний флакон або контейнер з металевого сплаву. У деяких втіленнях, металевий сплав являє собою нержавіючу сталь 316L або сплав "Хастеллой".

В іншому аспекті в даній заявці пропонується спосіб лікування захворювання або розладу у об'єкта, який включає введення об'єкту ефективної кількості композиції, описаної в даній заявці, де захворювання або розлад вибрано із групи, що складається з інфекції, злоякісного новоутворення і запального захворювання.

Варто розуміти, що одна, деякі або усі властивості різних втілень, описаних у даній заявці, можуть бути об'єднані з утворенням інших втілень даного винаходу. Ці й інші аспекти винаходу очевидні фахівцю в даній галузі. Ці й інші втілення винаходу додатково описані за допомогою докладного опису, який представлений далі.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фіг. 1 являє собою ряд графіків, що демонструють статистичний аналіз даних стабільності композицій α -PD-L1 при 40 °C, одержаних за допомогою ICIEF (капілярне ізоелектричне фокусування під контролем зображення) з використанням програмного забезпечення JMP. А) Середня втрата головного піка на основі дробового факторного дизайну експерименту (DOE). В) Аналіз головного піка на основі дробового факторного DOE. Головний пік містить заряджені частинки α -PD-L1 з таким же рН, як pI (ізоелектрична точка) молекули.

Фіг. 2 являє собою ряд графіків, що демонструють статистичний аналіз даних стабільності композицій α -PD-L1 при 25 °C, одержаних за допомогою ICIEF з використанням програмного

забезпечення JMP. А) Середня втрата головного піка на основі дробового факторного дизайну експерименту (DOE). В) Аналіз головного піка на основі дробового факторного DOE. Головний пік містить заряджені частинки α -PD-L1 з таким же рН, як pI (ізоелектрична точка) молекули.

Фіг. 3 являє собою ряд графіків, що демонструють статистичний аналіз даних стабільності композицій α -PD-L1 при 40 °C, одержаних за допомогою ексклюзивної ВЕРХ із використанням програмного забезпечення JMP. А) Середня втрата головного піка на основі дробового факторного дизайну експерименту (DOE). В) Аналіз головного піка на основі дробового факторного DOE. Головний пік містить мономер α -PD-L1.

Фіг. 4 являє собою ряд графіків, що демонструють статистичний аналіз даних стабільності композицій α -PD-L1 при 25 °C, одержаних за допомогою ексклюзивної ВЕРХ із використанням програмного забезпечення JMP. А) Середня втрата головного піка на основі дробового факторного дизайну експерименту (DOE). В) Аналіз головного піка на основі дробового факторного експерименту DOE. Головний пік містить мономер α -PD-L1.

Фіг. 5 являє собою графік, що демонструє відсутність значної деградації PS20 різних композицій α -PD-L1, які зберігали при різних температурах і часі. Графік процентного вмісту (%) PS20, що залишився у композиції, який детектували за допомогою випарного детектора світлорозсіювання (ELSD) у композиціях F1-F10. а відповідає нульовому моменту часу (T0); b відповідає 40 °C, 1M; c відповідає 25 °C, 2M; d відповідає 5 °C, 2M; e відповідає 5 °C, 6M; f відповідає 5 °C, 6M, 20-мл скляний флакон (GV), високе заповнення; i g відповідає 5 °C, 6M, 20-мл скляний флакон (GV), низьке заповнення.

Фіг. 6 являє собою ряд графіків, що демонструють стабільність композицій α -PD-L1, які зберігали при -20 °C або при 5 °C протягом до 6 місяців у скляному флаконі (GV). А) Графік процентного вмісту (%) мономера в композиціях після п'яти циклів заморожування-розморожування під час зберігання при -20 °C протягом зазначеного часу. В) Графік процентного вмісту (%) мономера в композиціях, які зберігали при 5 °C протягом зазначеного часу. С) Графік процентного вмісту (%) головного піка, одержаного з композиції після п'яти циклів заморожування-розморожування під час зберігання при -20 °C протягом зазначеного часу. D) Графік процентного вмісту (%) головного піка, одержаного з композиції, яку зберігали при 5 °C протягом зазначеного часу.

Фіг. 7 являє собою ряд графіків, що демонструють стабільність композиції α -PD-L1 після трьох циклів заморожування-розморожування і зберігання в невеликій банці з нержавіючої сталі (SS) або зі сплаву "Хастеллой". А) Графік процентного вмісту (%) мономера в композиції після зберігання при зазначеній температурі протягом 3 місяців. В) Графік процентного вмісту (%) головного піка в композиції після зберігання при зазначеній температурі протягом 3 місяців.

Фіг. 8 являє собою ряд графіків, що демонструють стабільність композиції α -PD-L1 при зберіганні в 20-мл флаконі. А) Графік процентного вмісту (%) мономера в композиції після зберігання при зазначеній температурі протягом 3 місяців. В) Графік процентного вмісту (%) головного піка в композиції після зберігання при зазначеній температурі протягом 3 місяців.

Фіг. 9 являє собою ряд графіків, що демонструють стабільність композицій α -PD-L1, які містять різні концентрації PS20 при збовтуванні в скляних флаконах. А) Графік процентного вмісту (%) мономера в композиціях після збовтування протягом зазначеного часу при кімнатній температурі. В) Графік каламутності по вимірюваннях за допомогою поглинання при 350 нм після збовтування протягом зазначеного часу при кімнатній температурі.

Фіг. 10 являє собою графік, що демонструє стабільність композицій α -PD-L1, які зберігали в скляних флаконах протягом періоду часу при зазначеній температурі і потім піддавали збовтуванню. Зміну процентного вмісту мономера в композиціях вимірювали за допомогою SEC (ексклюзивна хроматографія).

Фіг. 11 являє собою ряд графіків, що демонструють порівняльність втрат α -PD-L1 на тиждень при підвищенні рН. А) Графік процентного вмісту втрат (%) мономера на тиждень у композиції після зберігання при 40 °C. В) Графік процентного вмісту втрат (%) головного піка на тиждень у композиції після зберігання при 40 °C.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС

I. Визначення

Перед тим, як винахід буде докладно описаний, варто розуміти, що він не обмежений конкретними композиціями або біологічними системами, які, звичайно, можуть варіюватися. Також зрозуміло, що використовувана в даній заявці термінологія призначена винятково для цілей опису конкретних втілень і не призначена для обмеження. При використанні в англійській мові даного опису й у прикладеній формулі винаходу форми однини "a", "an" і "the" включають множину доти, поки з контексту очевидно не випливає інше. Таким чином, наприклад, посилаючись на "молекулу (a molecule)" необов'язково включають комбінацію двох або більше

таких молекул і т. п.

Термін "приблизно" при використанні в даній заявці стосується звичайного інтервалу похибки для відповідного значення, що добре відомий фахівцю в даній галузі. Посилання на "срязкове" значення або параметр у даній заявці включає (і описує) втілення, які стосуються, по суті, значення або параметра.

Зрозуміло, що аспекти і втілення винаходу, описані в даній заявці, включають "які містять", "які складаються" і "які по суті складаються з" аспектів і втілень.

Термін "фармацевтична композиція" стосується препарату, який представлений у такій формі, щоб дозволити біологічній активності активного інгредієнта бути ефективною, і який не містить ніяких додаткових компонентів, що неприйнятно токсичні відносно об'єкта, якому вводять цю композицію. Такі композиції стерильні. "Фармацевтично прийнятні" допоміжні речовини (носії, добавки) - це речовини, які можуть доцільно вводитися об'єкту-савцю з забезпеченням ефективної дози застосовуваного активного інгредієнта.

"Стерильна" композиція являє собою асептичну або вільну або по суті вільну від усіх живих мікроорганізмів і від їх спор.

"Заморожена" композиція являє собою композицію при температурі нижче 0 °С. Як правило, заморожена композиція не є ліофілізованою, не піддавалася ліофілізації раніше, не буде піддаватися згодом. У деяких втіленнях, заморожена композиція містить заморожену лікарську речовину для зберігання (у банці з нержавіючої сталі) або заморожений лікарський продукт (у флаконі кінцевої конфігурації).

"Стабільна" композиція являє собою таку композицію, у якій білок по суті зберігає свою фізичну стабільність і/або хімічну стабільність, і/або біологічну активність при зберіганні. Переважно, композиція по суті зберігає свою фізичну і хімічну стабільність, а також свою біологічну активність при зберіганні. Період зберігання, як правило, вибирають на основі призначеного терміну зберігання композиції. Різні аналітичні методи для вимірювання стабільності білка доступні в даній галузі і розглянуті, наприклад, у Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991), і Jones A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993). Стабільність може вимірюватися при вибраній температурі для вибраного періоду часу. Стабільність може оцінюватися якісно і/або кількісно множиною різних способів, які включають оцінку утворення агрегатів (наприклад, з використанням ексклюзійної хроматографії, шляхом вимірювання каламутності і/або за допомогою візуального огляду); шляхом оцінки гетерогенності заряду з використанням катіонообмінної хроматографії, капілярного ізоелектричного фокусування під контролем зображення (icIEF) або капілярного зонного електрофорезу; аналізу N-кінцевої або C-кінцевої послідовності; мас-спектрометричного аналізу; аналізу SDS-PAGE для порівняння зменшеного і інтактного антитіла; аналізу пептидної карти (наприклад, по трипсину або LYS-C); оцінки біологічної активності або антигензв'язувальної функції антитіла і т. д. Нестабільність може включати в себе будь-який один або декілька з наступних проявів: агрегацію, дезамідування (наприклад, дезамідування Asp), окислювання (наприклад, окислювання Met), ізомеризацію (наприклад, ізомеризацію Asp), кліпування/гідроліз/фрагментацію (наприклад, фрагментацію шарнірної ділянки), утворення сукциніміду, неспареного цистеїну(ів), N-кінцевої протяжки, C-кінцеве процесування, відмінності глікозилювання і т. д.

Білок "зберігає свою фізичну стабільність" у фармацевтичній композиції, якщо вона демонструє відсутність ознак агрегації або дуже слабку агрегацію, осадження і/або денатурацію при візуальній оцінці кольору і/або прозорості або по вимірюваннях за допомогою розсіювання УФ-випромінювання або за допомогою ексклюзійної хроматографії.

Білок "зберігає свою хімічну стабільність" у фармацевтичній композиції, якщо хімічна стабільність на даний час є такою, що передбачається, що білок усе ще зберігає свою біологічну активність, як визначено нижче. Хімічна стабільність може оцінюватися шляхом детектування і кількісної оцінки змінених форм білка. Хімічна зміна може включати в себе модифікацію розміру (наприклад, відсікання), яка може оцінюватися, наприклад, з використанням ексклюзійної хроматографії, SDS-PAGE і/або часопрототної мас-спектрометрії з лазерною іонізацією і десорбцією з рідкої матриці (MALDI/TOF MS). Інші типи хімічної зміни включають зміну заряду (наприклад, прояв у вигляді дезамідування), що може оцінюватися, наприклад, за допомогою іонообмінної хроматографії або icIEF.

Антитіло "зберігає свою біологічну активність" у фармацевтичній композиції, якщо біологічна активність антитіла на даний час складає щонайменше 60% (у межах похибки аналізу) біологічної активності, що демонструється під час приготування фармацевтичної композиції, яку визначали за допомогою аналізу (наприклад, аналізу зв'язування з антигеном). Інші аналізи "біологічної активності" для антитіл докладно розглянуті в даній заявці нижче.

При використанні в даній заявці, "біологічна активність" моноклонального антитіла включає здатність антитіла зв'язуватися з антигеном і, як результат, вимірювану біологічну реакцію, що може бути виміряна *in vitro* або *in vivo*.

5 "Дезамідоване" моноклональне антитіло в даній заявці являє собою таке антитіло, у якому один або декілька аспарагінових залишків є модифікованими, наприклад, до аспарагінової кислоти або до ізоаспарагінової кислоти.

"Окислене" моноклональне антитіло в даній заявці являє собою таке антитіло, у якому один або декілька залишків триптофану і/або один або декілька залишків метіоніну є окисленими.

10 "Глікозиловане" моноклональне антитіло в даній заявці являє собою таке антитіло, у якому один або декілька залишків лізину є глікозилованими.

Антитіло, яке "чутливе до дезамідування", являє собою антитіло, яке містить один або декілька залишків, які, як було виявлено, чутливі до дезамідування.

Антитіло, яке "чутливе до окислювання", являє собою антитіло, яке містить один або більше залишків, які, як було виявлено, чутливі до окислювання.

15 Антитіло, яке "чутливе до агрегації", являє собою антитіло, яке, як було виявлено, агрегує з іншими антитільними молекулами, особливо при заморожуванні і/або збовтуванні.

Антитіло, яке "чутливе до фрагментації", являє собою антитіло, яке, як було виявлено, розщеплюється на два або більше фрагментів, наприклад, у його шарнірній ділянці.

20 Під "зменшенням дезамідування, окислювання, агрегації або фрагментації" мають на увазі запобігання або зниження кількості дезамідування, окислювання, агрегації або фрагментації відносно моноклонального антитіла, яке включене в іншу композицію.

Антитіло, яке включене в композицію, переважно є чистим і бажано по суті гомогенним (наприклад, вільне від контамінуючих білків і т. д.). "По суті чисте" антитіло означає композицію, яка містить щонайменше приблизно 90 мас. % антитіла в перерахуванні на сумарну масу білків у композиції, переважно щонайменше приблизно 95 мас. %. "По суті чисте" антитіло означає композицію, яка містить щонайменше приблизно 90 мас. % антитіла в перерахуванні на сумарну масу білків у композиції, переважно щонайменше приблизно 95 мас. %.

30 Під "ізотонічною композицією" мають на увазі, що композиція, яка представляє інтерес, має по суті такий же осмотичний тиск, як у людській крові. Ізотонічність може бути виміряна, наприклад, з використанням осмометра з типом вимірювання по тиску пари або виробництва льоду.

Використаний тут термін, "буфер" стосується буферного розчину, який перешкоджає змінам рН дією його кислотного-основного спряжених компонентів. Буфер за даним винаходом переважно має рН в інтервалі приблизно від 4,5 приблизно до 7, переважно приблизно від 5,6 приблизно до 7, наприклад приблизно від 5,6 до 6,9, 5,7-6,8, 5,8-6,7, 5,9-6,6, 5,9-6,5, 6, 6-6,4 або 6,1-6,3. В одному втіленні, буфер має рН 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 або 7. Наприклад, фосфат натрію є прикладом буфера, що буде контролювати рН у даному інтервалі.

40 При використанні в даній заявці термін "поверхнево-активна речовина" стосується поверхнево-активного агента, переважно неіонної поверхнево-активної речовини. Приклади поверхнево-активних речовин даної заявки включають полісорбат (наприклад, полісорбат 20 і полісорбат 80); полксамер (наприклад, полксамер 188); Тритон; додецилсульфат натрію (SDS); лаурилсульфат натрію; октилглікозид натрію; лаурил-, міристил-, лінолеїл- або стеарилсульфобетаїн; лаурил-, міристил-, лінолеїл- або стеарилсаркозин; лінолеїл-, міристил- або цетилбетаїн; лауроамідопропіл-, кокамідпропіл-, лінолеамідопропіл-, міристамідопропіл-, пальмідопропіл- або ізостеарамідопропілбетаїн (наприклад, лауроамідопропіл); міристамідопропіл-, пальмідопропіл- або ізостеарамідопропілдиметиламін; натрію метилкокоїл-, або динатрію метилолеїлтаурат; і серії MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Патерсон, Нью Джерсі); поліетиленгліколь, поліпропіленгліколь і співполімери етиленгліколю і пропіленгліколю (наприклад, Pluronic, PF68 і т. д.); і т. д. В одному втіленні, поверхнево-активна речовина даної заявки являє собою полісорбат 20.

55 З фармацевтичної точки зору в контексті винаходу "терапевтично ефективна кількість" антитіла стосується кількості, ефективною для запобігання або лікування розладу, для лікування якого антитіло ефективне. "Розлад" являє собою патологічний стан, поліпшенню якого сприяє лікування з використанням антитіла. Це включає хронічні або гострі розлади або захворювання, що включають такі патологічні стани, які провокують ссавця до розглянутого розладу.

60 "Консервант" являє собою сполуку, яка необов'язково може бути включена в композицію для суттєвого скорочення там бактерій, таким чином сприяючи, наприклад, одержанню композиції для універсального використання. Приклади потенційних консервантів включають хлорид октадецилдиметилбензиламонію, хлорид гексаметонію, хлорид бензалконію (суміш хлоридів алкілбензилдиметиламонію, у яких алкільні групи є сполуками з довгим ланцюгом) і хлорид

бензетонію. Інші типи консервантів включають ароматичні спирти, такі як фенол, бутиловий і бензиловий спирти, алкілпарабени, такі як метилпарабен і пропілпарабен, катехол, резорцинол, циклогексанол, 3-пентанол і m-крезол. В одному втіленні, консервант даної заявки являє собою бензиловий спирт.

При використанні в даній заявці термін "лікування" стосується клінічного втручання, розробленого для зміни природного перебігу стану індивідуума або клітин, підданих лікуванню під час перебігу клінічної патології. Цільові ефекти лікування включають зменшення ступеня прогресії захворювання, ослаблення або полегшення хворобливого стану і ремісію або поліпшений прогноз. Наприклад, індивідуум успішно "піддається лікуванню", якщо один або більше симптомів, асоційованих зі злоякісним новоутворенням, пригнічуються або виключаються, включаючи, зокрема, зменшення проліферації (або порушення) злоякісних клітин, зменшення симптомів, які є результатом захворювання, поліпшення якості життя страждаючих на захворювання, зменшення дози інших лікарських засобів, які вимагаються для лікування захворювання, уповільнення прогресії захворювання і/або пролонгацію виживання індивідуумів.

При використанні в даній заявці, термін "затримка прогресії захворювання" означає відстрочку, гальмування, уповільнення, затримку, стабілізацію і/або відкладений розвиток захворювання (такого як злоякісне новоутворення). Дана затримка може мати варіації по тривалості часу залежно від історії розвитку захворювання і/або від індивідуума, що піддається лікуванню. Фахівцю в даній галузі очевидно, що достатня або значна затримка може охоплювати по суті запобігання, при якому у індивідуума не розвивається захворювання. Наприклад, може затримуватися пізня стадія злоякісного новоутворення, така як розвиток метастазів.

"Ефективна кількість" являє собою щонайменше мінімальну кількість, необхідну для одержання ефекту у вигляді вимірюваного поліпшення або запобігання конкретному розладу. Ефективна кількість відповідно до даної заявки може варіювати відповідно до таких факторів, як стан захворювання, вік, стать і маса індивідуума, а також здатність антитіла викликати цільову відповідь у індивідуума. Ефективна кількість також являє собою таку кількість, при якій терапевтично корисні ефекти перевищують будь-які токсичні або шкідливі ефекти від лікування. Для профілактичного застосування корисні або цільові результати включають такі результати, як виключення або зменшення ризику, ослаблення тяжкості або уповільнення прояву захворювання, включаючи біохімічні, гістологічні і/або поведінкові симптоми захворювання, його ускладнення і проміжні патологічні фенотипи, що виявляються під час розвитку захворювання. Для терапевтичного застосування корисні або цільові результати включають клінічні результати, такі як зменшення одного або декількох симптомів, які є наслідком захворювання, підвищення якості життя страждаючих на такі захворювання, зменшення дози інших лікарських засобів, які вимагаються для лікування захворювання, посилення ефекту іншого лікарського засобу, як, наприклад, через спрямований вплив, що уповільнює прогресію захворювання, і/або пролонгація виживаності. У випадку злоякісного новоутворення або пухлини, ефективна кількість лікарського засобу може мати ефект у зменшенні злоякісних клітин; зменшенні розміру пухлини; інгібуванні (тобто уповільненні до деякої міри або бажано припиненні) інфільтрації злоякісних клітин у периферичні органи; інгібуванні (тобто уповільненні до деякої міри або бажано припиненні) метастазування пухлини; інгібуванні до деякої міри пухлинного росту і/або полегшенні до деякої міри одного або декількох симптомів, асоційованих з розладом. Ефективна кількість може вводитися за допомогою одного або декількох введень. Для цілей даного винаходу, ефективна кількість лікарського засобу, сполуки або фармацевтичної композиції являє собою кількість, достатню для здійснення терапевтичного лікування або прямо, або побічно. Як можна зрозуміти з клінічного контексту, ефективна кількість лікарського засобу, сполуки або фармацевтичної композиції може або не може досягатися разом з іншим лікарським засобом, сполукою або фармацевтичною композицією. Таким чином, "ефективна кількість" може розглядатися в контексті введення одного або декількох терапевтичних агентів, і єдиний агент може розглядатися як прийнятий в ефективній кількості разом з одним або декількома іншими агентами, якщо може бути досягнутий або досягається цільовий результат.

При використанні в даній заявці, термін "разом з" стосується введення одного способу лікування додатково до іншого способу лікування. Як такий термін "разом з" стосується введення індивідууму одного способу лікування перед, під час або після введення іншого способу лікування.

"Розлад" являє собою будь-який патологічний стан, який буде мати користь від лікування і який включає, зокрема, хронічний і гострий розлад або захворювання, що включає такі патологічні стани, які провокують ссавця до розглянутого розладу.

Терміни "клітинно-проліферативний розлад" і "проліферативний розлад" стосуються розладів, які асоційовані з деяким ступенем аномальної клітинної проліферації. В одному втіленні, клітинно-проліферативний розлад являє собою злоякісне новоутворення. В одному втіленні, клітинно-проліферативний розлад являє собою пухлину.

5 Термін "пухлина" при використанні в даній заявці стосується росту всіх неопластичних клітин і проліферації або злоякісних, або доброякісних і всіх передзлаякісних і злоякісних клітин і тканин. Терміни "злоякісне новоутворення", "злоякісний", "клітинно-проліферативний розлад", "проліферативний розлад" і "пухлина" не є взаємовиключними відповідно до даної заявки.

10 Терміни "злоякісне новоутворення" і "злоякісний" стосуються або описують фізіологічний стан у ссавців, який, як правило, характеризується нерегульованим клітинним ростом. Приклади злоякісного новоутворення включають, зокрема, карциному, лімфому, бластоми, саркому і лейкоз або лімфоїдні злоякісні новоутворення. Більш конкретні приклади таких злоякісних новоутворень включають, зокрема, плоскоклітинний рак (наприклад, епітеліальний плоскоклітинний рак), рак легені, що включає дрібноклітинний рак легені, недрібноклітинний рак легені, аденокарциному легені і плоскоклітинну карциному легені, рак черевної порожнини, гепатоклітинний рак, кишковий або шлунковий рак, що включає шлунково-кишковий рак і шлунково-кишковий стромальний рак, рак підшлункової залози, гліобластоми, рак шийки матки, рак яєчників, рак печінки, рак сечового міхура, рак сечостатевого тракту, гепатому, рак молочної залози, рак прямої кишки, ректальний рак, колоректальний рак, ендометріальну або маткову карциному, карциному слинної залози, рак нирки або нирковий рак, рак передміхурової залози, рак вульви, рак щитовидної залози, карциному печінки, анальну карциному, пеніальну карциному, меланому, поверхнево поширювану меланому, лентиго-меланому, акральну лентигозну меланому, вузлові меланоми, множинні мієломи і В-клітинні лімфоми (у тому числі низькодиференційована/фолікулярна неходжкінська лімфома (НХЛ), невелика лімфоцитарна (SL) НХЛ; середньодиференційована/фолікулярна НХЛ; середньодиференційована дифузна НХЛ; високодиференційована імунобластна НХЛ; високодиференційована лімфобластна НХЛ, високодиференційована дрібноклітинна з розщепленими ядрами НХЛ, НХЛ із масивним ураженням, лімфома з клітин мантийної зони, пов'язана зі СНІДом лімфома і макроглобулінемія Вальденстрема); хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ); гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ); волосатоклітинний лейкоз; хронічний мієлобластний лейкоз і посттрансплантаційні лімфопроліферативні розлади (PTLD), а також аномальна проліферація судин, асоційована з факоматозами, набряк (як, наприклад, пов'язаний з пухлинами головного мозку), синдром Мейгса, злоякісне новоутворення головного мозку, а також рак голови і шиї і асоційовані з ними метастази. У деяких втіленнях, злоякісні новоутворення, що піддаються лікуванню за допомогою антитіл за винаходом, включають рак молочної залози, колоректальний рак, ректальний рак, недрібноклітинний рак легені, гліобластоми, неходжкінську лімфому (NHL), нирковоклітинну карциному, рак передміхурової залози, рак печінки, рак підшлункової залози, саркому м'яких тканин, саркому Капоші, карциноїдну саркому, рак голови і шиї, рак яєчників, мезотеліому і множинну мієлому. У деяких втіленнях, рак вибирають з: дрібноклітинного раку легені, гліобластоми, нейробластоми, меланоми, раку молочної залози, раку шлунка, колоректального раку (CRC), гепатоклітинної карциноми. Ще в деяких втіленнях, рак вибирають з: недрібноклітинного раку легені, колоректального раку, гліобластоми і раку молочної залози, включаючи метастазуючі форми цих типів раку.

45 "Хіміотерапевтичний агент" є хімічною сполукою, застосовною при лікуванні злоякісних новоутворень. Приклади хіміотерапевтичних агентів включають алкілувальні агенти, такі як тіотепа і циклофосфамід (CYTOXAN®); алкілсульфонати, такі як бусульфан, імпросульфан і піпосульфан; азириди, такі як бензодопа, карбоквон, метуредопа й уредопа; етиленіміни і метилмеламіни, що включають алтретамін, триетиленмеламін, триетиленфосфорамід, триетилентіофосфорамід і триметилмеламін; ацетогеніни (особливо булатацин і булатацинон); дельта-9-тетрагідроканабінол (дронабінол, MARINOL®); бета-лапачон; лапачол; колхіцини; бетулінова кислота; камптотецин (що включає синтетичний аналог топотекан (HYCAMTIN®), CPT-11 (іринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин і 9-амінокамптотецин); бріостатин; калістатин; CC-1065 (що включає його синтетичні аналоги адозелезин, карзелезин і бізелезин); подофілотоксин; подофілінову кислоту; теніпозид; криптофіцини (конкретно, криптофіцин 1 і криптофіцин 8); доластатин; дуокарміцин (включаючи його синтетичні аналоги, KW-2189 і CB1-TM1); елеутеробін; панкратистатин; саркодиктін; спонгістатин; мустаргени, такі як хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамід, естрамустин, іфосфамід, мехлоретамін, мехлоретаміноксиду гідрохлорид, мелфалан, новембехін, фенестерин, преднімустин, трофосфамід, урамустин; нітрозосечовину, таку як кармустин, 60 хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, німустин і ранімустин; антибіотики, такі як енедіїнові

антибіотики (наприклад, каліхіміцин, особливо каліхіміцин гамма1I і каліхіміцин омега1I (див., наприклад, Nicolaou et al., Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)); CDP323, пероральний інгібітор інтегрину альфа-4; динеміцин, включаючи динеміцин А; еспераміцин; а також неокарцинонстатин хромофор і споріднені хромопротеїнові хромофори енедіїнових антибіотиків),

5 аклациномізини, актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеомицини, кактиноміцин, карабіцин, каміноміцин, карзинофілін, хромоміцини, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубіцин (включаючи ADRIAMYCIN®, морфолінодоксорубіцин, ціаноморфолінодоксорубіцин, 2-піролінодоксорубіцин, доксорубіцину HCl ліпосомна ін'єкція (DOXIL®), ліпосомний доксорубіцин TLC D-99 (MYOCET®), пегільований ліпосомний

10 доксорубіцин (CAELYX®) і дезоксидоксорубіцин), епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, марселоміцин, мітоміцини, такі як мітоміцин С, мікофенолова кислота, ногаламіцин, оливоміцини, пепломіцин, порфіроміцин, пуроміцин, квеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидин, убенімекс, зиностатин, зорубіцин; антиметаболіти, такі як метотрексат, гемцитабін (GEMZAR®), тегафур (UFTORAL®), капецитабін (XELODA®), епотилон

15 і 5-фторурацил (5-FU); комбретастатин; фолієву кислоту і її аналоги, такі як деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; пуринові аналоги, такі як флударабін, 6-меркаптопурин, тіаміприн, тіогуанін; піримідинові аналоги, такі як анцитабін, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабін, дидезоксіуридин, доксифлуридин, еноцитабін, флоксуридин; андрогени, такі як калустерон, дромостанолону пропіонат, епітіостанол, мепітіостан,

20 тестолактон; антиадренергчні агенти, такі як аміноглутетимід, мітотан, трилостан; засіб, що поповнює фолієву кислоту, такий як фролінова кислота; ацеглатон; алдофосфаміду глікозид; амінолевулінову кислоту; енілурацил; амсакрин; бестрабуцил; бісантрен; едотраксат; дефофамін; демеколцин; діазиквон; елформітин; еліптинію ацетат; епотилон; етоглуцид; нітрат галію; гідроксисечовину; лентинан; лонідаїнін; майтансиноїди, такі як майтансин і ансамітоцини;

25 мітогуазон; мітоксантрон; мопіданмол; нітраерин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; лозоксантрон; 2-етилгідразид; прокарбазин; PSK® полісахаридний комплекс (JHS Natural Products, Юджин, Орегон); разоксан; ризоксин; сизофіран; спірогерманій; тенуазонову кислоту; триазиквон; 2,2',2'-трихлортриетиламін; трихотецени (особливо Т-2 токсин, веракурин А, роридин А і ангуїдин); уретан; віндезин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; маномустин;

30 мітобронітол; мітолактол; піоброман; гацитозин; арабінозид ("Ara-C"); тіотепу; таксоїд, наприклад паклітаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью Джерсі), сконструйований з альбуміном склад паклітакселу з наночастинок (ABRAXANE™) і доцетаксел (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Антоні, Франція); хлоранбуцил; 6-тіогуанін; меркаптопурин; метотрексат; агенти платини, такі як цисплатин, оксалиплатин (наприклад, ELOXATIN®) і карбоплатин; похідні барвінку, що попереджають полімеризацію тубуліну від утворення мікротрубочок, які включають вінбластин (VELBAN®), вінкрисдин (ONCOVIN®), віндезин (ELDISINE®, FILDESIN®) і вінорелбін (NAVELBINE®); етопозид (VP-16); іфосфамід;

35 мітоксантрон; лейковорин; новантрон; едотрексат; дауноміцин; аміноптерин; ібандронат; інгібітор топоізомерази RFS 2000; дифторметилорнітин (DMFO); ретиноїди, такі як ретиноєва кислота, включаючи бексаротен (TARGRETIN®); біфосфонати, такі як клодронат (наприклад, BONEFOS® або OSTAC®), етидронат (DIDROCAL®), NE-58095, золедроновна кислота/золедронат (ZOMETAX®), алендронат (FOSAMAX®), памідронат (AREDIA®), тилудронат (SKELID®) або ризедронат (ACTONEL®); троксацитабін (аналог цитозину 1,3-діоксолану нуклеозид); антисмислові олігонуклеотиди, конкретно ті, котрі інгібують експресію генів у

40 сигнальних шляхах, залучених в аномальну клітинну проліферацію, такі як, наприклад, PKC-альфа, Raf, H-Ras, і рецептор епідермального фактора росту (EGF-R) (наприклад, ерлотиніб (Tarceva™)); і VEGF-A, що знижує клітинну проліферацію; вакцини, такі як вакцина THERATOPE® і вакцини генної терапії, наприклад вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® і вакцина VAXID®; інгібітор топоізомерази 1 (наприклад, LURTOTECAN®); rmRH (наприклад, ABARELIX®); BAY439006 (сорафеніб; Bayer); SU-11248 (сунітиніб, SUTENT®, Pfizer); перифозин, інгібітор COX-2 (наприклад, целекоксиб або еторикоксиб), протеасомний інгібітор (наприклад, PS341); бортезоміб (VELCADE®); CCI-779; типіфарніб (R11577); орафеніб, ABT510; інгібітор Bcl-2, такий як облімерсен натрію (GENA SENSE®); піксантрон; інгібітори EGFR; тирозинкіназні інгібітори; серин-треонінкіназні інгібітори, такі як рапаміцин (сиролімум, RAPAMUNE®); фарнезилтрансферазні інгібітори, такі як лонафарніб (SCH 6636, SARASAR™); і

55 їх фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні, а також комбінації двох або більше з перерахованих вище, такі як CHOP, скорочення для комбінованої терапії циклофосфаміду, доксорубіцину, вінкристину і преднізолону; і FOLFOX, скорочення для режиму лікування з використанням оксалиплатину (ELOXATIN™) разом з 5-FU і лейковорином, і їх фармацевтично

60 прийнятні солі, кислоти або похідні, а також комбінації двох або більше з перерахованих вище.

Хіміотерапевтичні агенти, як визначено в даній заявці, включають "антигормональні агенти" або "ендокринні терапевтичні засоби", які діють шляхом регуляції, зменшення, блокування або інгібування ефектів гормонів, що можуть стимулювати ріст злоякісного новоутворення. Вони самі можуть бути гормонами, включаючи, зокрема: антиестрогени і селективні модулятори рецептора естрогену (SERM), що включають, наприклад, тамоксифен (включаючи NOLVADEX® тамоксифен), ралоксифен, дролоксифен, 4-гідротамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон і FARESTON.cndot.тореміфен; інгібітори ароматази, які інгібують фермент ароматазу, що регулює продукування естрогенів у наднирковій залозі, такі як, наприклад, 4(5)-імідазоли, аміноглутетимід, MEGASE® мегестролу ацетат, AROMASIN® ексеместан, форместан, фадрозол, RIVISOR® ворозол, FEMARA® летрозол і ARIMIDEX® анастрозол; і антиандрогени, такі як флутамід, нілутамід, бікалутамід, леупролід і гозерелін; а також троксацитабін (аналог цитозину 1,3-діоксолану нуклеозид); антисмислові олігонуклеотиди, конкретно ті, котрі інгібують експресію генів сигнальних шляхів, залучених в аномальну клітинну проліферацію, такі як, наприклад, PKC-альфа, Raf і H-Ras; рибозими, такі як інгібітор експресії VEGF (наприклад, ANGIOZYME® рибозим) і інгібітор експресії HER2; вакцини, такі як вакцини генної терапії, наприклад вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® і вакцина VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; інгібітор топоізомерази 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® gmRH; вінорелбін і еспераміцини (див. пат. США № 4675187), і їх фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-якого з перерахованих вище; а також комбінації двох або більше з перерахованих вище.

При використанні в даній заявці, термін "агент, інгібуючий ріст", стосується сполуки або композиції, що інгібує ріст клітини або *in vitro*, або *in vivo*. В одному втіленні, агент, інгібуючий ріст, являє собою антитіло, інгібуюче ріст, що запобігає або зменшує клітинну експресію антигену, з яким зв'язується антитіло. В іншому втіленні, агент, інгібуючий ріст, може являти собою такий агент, що значно зменшує процентний вміст клітин у S-фазі. Приклади агентів, інгібуючих ріст, включають агенти, що блокують прогресію клітинного циклу (у точці, відмінній від S-фази), як, наприклад, агенти, що індукують G1-арешт і арешт M-фази. Класичні M-фазові блокатори включають алкалоїди барвінку (вінкристин і вінбластин), таксани й інгібітори топоізомерази II, такі як доксорубіцин, епірубіцин, даунорубіцин, етопозид і блеоміцин. Такі агенти, які блокують G1, також перетікають в арешт S-фази, наприклад ДНК-алкілувальні агенти, такі як тамоксифен, преднізон, дакарбазин, мехлоретамін, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил і цитарабін. Додаткову інформацію можна знайти в Mendelsohn and Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer, Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs", Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), наприклад, стор. 13. Таксани (паклітаксел і доцетаксел) являють собою протиракові лікарські засоби, які обидва виділені з тисового дерева. Доцетаксел (TAKCOTEP®, Rhone-Poulenc Rorer), виділений з тиса європейського, являє собою напівсинтетичний аналог паклітакселу (TAKCOL®, Bristol-Myers Squibb). Паклітаксел і доцетаксел стимулюють збирання мікротрубочок з димерів тубуліну і стабілізують мікротрубочки шляхом запобігання деполімеризації, що приводить до інгібування мітозу в клітинах.

Під "радіаційною терапією" розуміють застосування спрямованого гамма-випромінювання для індукції достатнього uszkodження клітини так, щоб обмежити її здатність нормально функціонувати, і для повного руйнування клітини. Зрозуміло, що існує багато способів, відомих у даній галузі, для визначення дозування і тривалості терапії. Типові терапії представлені у вигляді однократного введення, і типовий інтервал дозування складає від 10 до 200 одиниць (Грей) на день.

"Об'єкт" або "індивідуум" для цілей лікування стосується будь-якої тварини, класифікованої як ссавець, включаючи людей, домашніх і сільськогосподарських тварин і тварин зоопарків, спортивних тваринних або домашніх вихованців, таких як собаки, кішки, корови і т. д. Переважно, ссавець являє собою людину.

У даній заявці, термін "антитіло" використовується в широкому розумінні і специфічно охоплює моноклональні антитіла (включаючи повнорозмірні моноклональні антитіла), поліклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) і фрагменти антитіл, за умови, що вони демонструють цільову біологічну активність.

"Виділене" антитіло являє собою антитіло, яке було ідентифіковане і відділене і/або витягнуте з компонента його природного середовища. Забруднюючі компоненти його природного середовища являють собою речовини, що будуть перешкоджати дослідницькому, діагностичному або терапевтичному застосуванню антитіла і можуть включати ферменти, гормони й інші білкові або небілкові розчини. У деяких втіленнях, антитіло очищене до ступеня (1) більше ніж 95 % по масі антитіла, як визначено, наприклад, за допомогою методу Лоурі, і в

деяких втіленнях до ступеня більше ніж 99% по масі; (2) до ступеня, достатнього для одержання щонайменше 15 залишків N-кінцевої або внутрішньої амінокислотної послідовності шляхом використання, наприклад, секвенатора з обертовим стаканом, або (3) до ступеня гомогенності за допомогою SDS-PAGE при відновних і невідновних умовах з використанням, наприклад, забарвлення Кумасі синім або сріблом. Виділене антитіло включає антитіло *in situ* усередині рекомбінантних клітин, оскільки буде відсутній щонайменше один компонент природного середовища антитіла. Однак звичайно виділене антитіло одержують за допомогою щонайменше однієї стадії очищення.

"Нативні антитіла" звичайно являють собою гетеротетрамерні глікопротеїни приблизно 150000 дальтон, які складаються з двох ідентичних легких ланцюгів (L) і двох ідентичних важких ланцюгів (H). Кожен легкий ланцюг зв'язаний з важким ланцюгом одним ковалентним дисульфідним зв'язком, у той час як кількість дисульфідних зв'язків варіюється серед важких ланцюгів імуноглобулінів різних ізотипів. Кожен важкий і легкий ланцюг також містить періодично розділені внутрішньоланцюжкові дисульфідні містки. Кожен важкий ланцюг містить на одному кінці варіабельний домен (VH), за яким іде ряд константних доменів. Кожен легкий ланцюг містить на одному кінці варіабельний домен (VL) і на іншому кінці константний домен; константний домен легкого ланцюга з'єднаний з першим константним доменом важкого ланцюга і варіабельний домен легкого ланцюга з'єднаний з варіабельним доменом важкого ланцюга. Вважається, що конкретні амінокислотні залишки утворюють проміжний простір між варіабельними доменами легкого ланцюга і важкого ланцюга.

Термін "константний домен" стосується області молекули імуноглобуліну, яка містить більш консервативну амінокислотну послідовність відносно іншої області імуноглобуліну, варіабельного домену, що містить антигензв'язувальний сайт. Константний домен містить домени CH1, CH2 і CH3 (разом, CH) важкого ланцюга і домени CHL (або CL) легкого ланцюга.

"Варіабельна ділянка" або "варіабельний домен" антитіла стосується N-кінцевих доменів важкого або легкого ланцюга антитіла. Варіабельний домен важкого ланцюга може позначатися як "VH". Варіабельний домен легкого ланцюга може позначатися як "VL". Ці домени, як правило, являють собою найбільш варіабельні частини антитіла і містять антигензв'язувальні сайти.

Термін "варіабельний" стосується того факту, що деякі області варіабельних доменів суттєво відрізняються по послідовності серед антитіл і використовуються для зв'язування і специфічності кожного конкретного антитіла з його конкретним антигеном. Однак варіабельність не розподілена рівномірно по варіабельних доменах антитіл. Вона сконцентрована в трьох сегментах, названих гіперваріабельними ділянками (HVR) у варіабельних доменах як легкого ланцюга, так і важкого. Більш високо консервативні області варіабельних доменів називають каркасними ділянками (FR). Кожний з варіабельних доменів нативних важкого і легкого ланцюгів включає чотири ділянки FR, які в основному приймають конфігурацію бета-листа, що зв'язані за допомогою трьох HVR, які утворюють петлі зв'язування, і, у деяких випадках, з утворенням частини бета-складчастої структури. HVR у кожному ланцюзі тримаються разом у близькому розташуванні за допомогою ділянок FR, і використання HVR з іншого ланцюга сприяє утворенню антигензв'язувального сайту антитіла (див. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). Константні домени не залучені безпосередньо в зв'язування антитіла з антигеном, але демонструють різні ефекторні функції, такі як участь антитіла в антитілозалежній цитотоксичності клітини.

"Легкі ланцюги" антитіл (імуноглобулінів) з будь-якого виду ссавця можуть бути віднесені до одного з двох типів, що чітко розрізняються, названих каппа ("κ") і лямбда ("λ"), на основі амінокислотних послідовностей їх константних доменів.

При використанні в даній заявці, термін "ізотип" або "підклас" IgG означає будь-який з підкласів імуноглобулінів, визначуваних хімічними або антигенними характеристиками їх константних ділянок.

Залежно від амінокислотних послідовностей константних доменів їх важких ланцюгів, антитіла (імуноглобуліни) можуть бути віднесені до різних класів. Існує п'ять головних класів імуноглобулінів: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, і декілька з них можуть додатково підрозділятися на підкласи (ізотипи), наприклад IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2. Константні домени важкого ланцюга, що відповідають різним класам імуноглобулінів, називаються α, γ, ε, γ і μ відповідно. Структури субодиниць і тривимірні конфігурації різних класів імуноглобулінів добре відомі і, загалом, описані, наприклад, у Abbas et al. *Cellular and Mol. Immunology*, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). Антитіло може бути частиною більш великої зшиті молекули, утвореної за допомогою ковалентної або нековалентної асоціації антитіла з одним або декількома іншими білками або пептидами.

Терміни "повнорозмірне антитіло", "інтактне антитіло" і "цільне антитіло" використовуються в

даний заявці взаємозамінно для позначення антитіла в його по суті інтактній формі, а не у формі фрагментів антитіла, визначених нижче. Терміни конкретно стосуються антитіла з важкими ланцюгами, що містять Fc-ділянку.

"Голе антитіло" для цілей даної заявки являє собою антитіло, яке не кон'юговане з цитотоксичним компонентом або з радіоактивною міткою.

"Фрагменти антитіла" містять область інтактного антитіла, яка переважно містить його антигензв'язувальну ділянку. У деяких втіленнях, фрагмент антитіла, описаний у даній заявці, являє собою антигензв'язувальний фрагмент. Приклади фрагментів антитіла включають фрагменти Fab, Fab', F(ab')₂ і Fv; діатіла; лінійні антитіла; одноланцюжкові антитільні молекули і мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіла.

У результаті гідролізу антитіл папаїном одержують два ідентичні антигензв'язувальні фрагменти, називані фрагментами "Fab", кожний з яких містить єдиний антигензв'язувальний сайт, і фрагмент "Fc", що залишився, назва якого відображає його здатність легко кристалізуватися. У результаті обробки пепсином одержують фрагмент F(ab')₂, який містить два антигензв'язувальні сайти і зберігає здатність перехресного зв'язування з антигеном.

"Fv" являє собою мінімальний фрагмент антитіла, який містить повний антигензв'язувальний сайт. В одному втіленні, дволанцюжковий тип Fv складається з димеру одного варіабельного домену важкого ланцюга й одного варіабельного домену легкого ланцюга в нековалентній асоціації. В одноланцюжковому типі Fv (scFv) один варіабельний домен важкого ланцюга й один варіабельний домен легкого ланцюга можуть бути ковалентно зв'язані з гнучким пептидним лінкером, так що легкий і важкий ланцюги можуть асоціювати в "димерну" структуру, аналогічну структурі дволанцюжкового типу Fv. У даній конфігурації три HVR кожного варіабельного домену взаємодіють для визначення антигензв'язувального сайту на поверхні димеру VH-VL. Разом, шість HVR надають антитілу антигензв'язувальну специфічність. Однак, навіть єдиний варіабельний домен (або половина Fv, що містить тільки три HVR, специфічні до антигену) має здатність розпізнавати і зв'язувати антиген, хоча і з більш низькою афінністю, ніж повний зв'язувальний сайт.

Фрагмент Fab містить варіабельні домени важкого і легкого ланцюгів, а також містить константний домен легкого ланцюга і перший константний домен (CH1) важкого ланцюга. Фрагменти Fab' відрізняються від фрагментів Fab вставкою декількох залишків у С-кінець домену CH1 важкого ланцюга, включаючи один або декілька цистеїнів із шарнірної ділянки антитіла. Fab'-SH у даній заявці являє собою позначення для Fab', у якому залишки цистеїну константних доменів несуть вільну тиольну групу. Фрагменти антитіла F(ab')₂ початково були одержані у вигляді пар фрагментів Fab', що містять шарнірні цистеїни між ними. Також відомо про інші хімічні зв'язки фрагментів антитіла.

Фрагменти антитіла "одноланцюжковий Fv" або "scFv" містять домени антитіла VH і VL, де ці домени присутні в одиночному поліпептидному ланцюзі. Як правило, поліпептид scFv додатково містить поліпептидний лінкер між доменами VH і VL, що дозволяє scFv утворювати необхідну структуру для зв'язування антигену. Для огляду scFv див., наприклад, Pluckthün, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315.

Термін "діатіла" стосується фрагментів антитіл із двома антигензв'язувальними сайтами, де фрагменти містять варіабельний домен важкого ланцюга (VH), з'єднаний з варіабельним доменом легкого ланцюга (VL) в одному і тому ж поліпептидному ланцюзі (VH-VL). При використанні лінкера, який є занадто коротким, щоб дозволити спарювання між двома доменами на одному і тому ж ланцюзі, домени змушені зв'язуватися з комплементарними доменами іншого ланцюга і утворюють при цьому два антигензв'язувальні сайти. Діатіла можуть бути бівалентними або біспецифічними. Більш повно діатіла описані, наприклад, у EP 404097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); і Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993). Тритіла і тетратіла також описані в Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

При використанні в даній заявці термін "моноклональне антитіло" стосується антитіла, одержаного з популяції по суті гомогенних антитіл, наприклад індивідуальних антитіл, що складають популяцію, які є ідентичними за винятком можливих мутацій, наприклад природних мутацій, що можуть бути присутні у мінорних кількостях. Таким чином, позначення "моноклональне" указує на характер антитіла в тому розумінні, що воно не є сумішшю дискретних антитіл. У деяких втіленнях, таке моноклональне антитіло, як правило, включає антитіло, яке містить поліпептидну послідовність, що зв'язується з мішенню, де поліпептидну послідовність, що зв'язує мішень, одержували способом, який включає селекцію поліпептидних послідовностей, що зв'язують єдину мішень, з множини поліпептидних послідовностей.

Наприклад, процес селекції може являти собою селекцію унікального клону з множини клонів, як, наприклад, з пулу гібридомних клонів, фагових клонів або клонів рекомбінантної ДНК. Варто розуміти, що селектована послідовність, що зв'язує мішень, може бути додатково змінена, наприклад, для поліпшення афінності до мішені, для гуманізації послідовності, що зв'язує мішень, для поліпшення продукування в клітинній культурі, для зменшення її імуногенності *in vivo*, для створення мультиспецифічного антитіла і т. д., і що антитіло, яке містить змінену послідовність, що зв'язує мішень, також являє собою моноклональне антитіло за даним винаходом. На відміну від препаратів поліклональних антитіл, які, як правило, включають різні антитіла, спрямовані проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло препарату моноклонального антитіла спрямоване проти одиночної детермінанти на антигені. Додатково до їх специфічності препарати моноклональних антитіл переважно являють собою такі, у яких вони, як правило, не забруднені іншими імуноглобулінами.

Позначення "моноклональне" указує на характер антитіла, одержаного по суті з гомогенної популяції антитіл, і не повинен тлумачитися як такий, що вимагає одержання антитіла яким-небудь конкретним способом. Наприклад, моноклональні антитіла, використовувані відповідно до винаходу, можуть бути одержані за допомогою множини методів, які включають, наприклад, гібридомний метод (наприклад, Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14(3):253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), методи рекомбінантної ДНК (див., наприклад, пат. США № 4816567), технології фагового дисплея (див., наприклад, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(34):12467-12472 (2004); і Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004)) і технології одержання у тварин людських антитіл і антитіл, подібних до людських, котрі містять частини або повні локуси людських імуноглобулінів або генів, кодуючих послідовності людських імуноглобулінів (див., наприклад, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); пат. США № 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425 і 5661016; Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature*, 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368:812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826 (1996); і Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)).

Моноклональні антитіла в даній заявці специфічно включають "химерні" антитіла, у яких частина важкого і/або легкого ланцюга є ідентичною або гомологічною відповідним послідовностям в антитілах, які одержані з конкретного виду або належать до конкретного класу або підкласу антитіл, тоді як залишок ланцюга(ів) ідентичний або гомологічний відповідним послідовностям в антитілах, які одержані з інших видів або належать до інших класів або підкласів антитіл, а також фрагментів таких антитіл, за умови, що вони демонструють цільову біологічну активність (див., наприклад, пат. США № 4816567; і Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Химерні антитіла включають антитіла PRIMATTZED®, де антигензв'язувальна ділянка антитіла виділена з антитіла, одержаного, наприклад, за допомогою імунізації макак з використанням антигену, що представляє інтерес.

"Гуманізовані" форми антитіл тваринного походження (наприклад, мишачі) являють собою химерні антитіла, які містять мінімальну послідовність, виділену з імуноглобуліну тваринного походження. В одному втіленні, гуманізоване антитіло являє собою людський імуноглобулін (реципієнтне антитіло), у якому залишки з HVR реципієнта замінені на залишки з HVR тваринного походження (донорне антитіло), такого як миша, щур, кролик або примати, відмінні від людини, що має цільову специфічність, афінність і/або здатність. У деяких випадках, залишки FR з людського імуноглобуліну замінюють відповідними залишками тваринного походження. Більше того, гуманізоване антитіло може містити залишки, що не виявлені в реципієнтному антитілі або в донорному антитілі. Ці модифікації можуть бути зроблені для подальшого удосконалювання ефективності антитіла. Загалом, гуманізоване антитіло буде містити по суті усі щонайменше з одного, як правило, двох варіабельних доменів, у яких усі або по суті всі гіперваріабельні петлі відповідають областям імуноглобуліну тваринного походження, а всі або по суті всі FR є областями послідовності людського імуноглобуліну. Гуманізоване антитіло необов'язково також буде містити щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну (Fc), як правило з людського імуноглобуліну. Для додаткових подробиць див., наприклад, Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); і Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Див. також, наприклад, Vaswani and Hamilton,

Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions, 23:1035-1038 (1995); Hurler and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994); і пат. США №№ 6982321 і 7087409.

"Людське антитіло" являє собою таке антитіло, яке має амінокислотну послідовність, що відповідає послідовності антитіла, продукованого людиною, і/або яке було одержане з використанням будь-якого з методів одержання людських антитіл, розкритих у даній заявці. Дане визначення людського антитіла специфічно виключає гуманізоване антитіло, що містить антигензв'язувальні залишки тваринного походження. Людські антитіла можуть бути одержані з використанням множини методів, відомих у даній галузі, включаючи метод бібліотек фагового дисплея. Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991). Також доступними для одержання людських моноклональних антитіл методами є методи, описані в Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991). Див. також van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5:368-74 (2001). Людські антитіла можуть бути одержані шляхом введення антигену трансгенній тварині, яка може бути модифікована для продукування таких антитіл у відповідь на антигенне стимулювання, але ендогенний локус якої ушкоджений, як, наприклад, у імунізованих ксеномишей (див., наприклад, пат. США №№ 6075181 і 6150584, що стосуються технології XENOMOUSE™). Див. також, наприклад, Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006), стосовно людських антитіл, генерованих за допомогою технології В-клітинної гібридомії.

"Видоспецифічне антитіло" являє собою антитіло, яке має більш сильну афінність зв'язування з антигеном з першого виду ссавця, ніж для гомологічного антигену з другого виду ссавця. Звичайно, видоспецифічне антитіло "специфічно зв'язується" з людським антигеном (наприклад, має значення афінності зв'язування (K_d) не більше ніж приблизно 1×10^{-7} М, переважно не більше ніж приблизно 1×10^{-8} М і переважно не більше ніж приблизно 1×10^{-9} М), але при цьому має афінність зв'язування з гомологічним антигеном із другого виду ссавця - нелюдини, що складає щонайменше приблизно в 50 разів слабкіше або щонайменше приблизно в 500 разів слабкіше або щонайменше приблизно в 1000 разів слабкіше, ніж афінність зв'язування з людським антигеном. Видоспецифічне антитіло може належати до будь-якого з різних типів антитіл, визначених вище, але переважно воно є гуманізованим або людським антитілом.

При використанні в даній заявці терміни "гіперваріабельна ділянка", "HVR" або "HV" стосуються ділянок варіабельного домену антитіла, які гіперваріабельні по послідовності і/або утворюють структурно визначені петлі. Як правило, антитіла містять шість HVR; три в VH (H1, H2, H3) і три в VL (L1, L2, L3). У нативних антитілах, H3 і L3 демонструють найбільшу різноманітність із шести HVR, і вважається, що особливо H3 відіграє унікальну роль у наданні антитілам специфічності. Див., наприклад, Xu et al., Immunity, 13:37-45 (2000); Johnson and Wu, in Methods in Molecular Biology, 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003). Фактично, природні верблюдячі антитіла, що складаються тільки з важкого ланцюга, є функціональними і стабільними за відсутності легкого ланцюга. Див., наприклад, Hamers-Casterman et al., Nature, 363:446-448 (1993); Sheriff et al., Nature, Struct. Biol. 3:733-736 (1996).

Застосовується ряд трансдиференціювань HVR, що охоплені даним винаходом. Ділянки, що визначають комплементарність по Kabat (CDR), основуються на варіабельності послідовності і найбільш часто використовуються (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Навпаки, Chothia посилається на локалізацію структурних петель (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). AbM HVR являють собою компроміс між Kabat HVR і структурними петлями Chothia і використовуються Оксфордською програмою молекулярного моделювання антитіл "Oxford Molecular's AbM". "Контактні" HVR основані на аналізі доступних комплексних кристалічних структур. Залишки з кожної з цих HVR відзначені нижче.

Петля	Kabat	AbM	Chothia	Контакт	
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36	
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55	
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96	
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B	(Нумерація по Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35	(Нумерація по Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58	
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101	

HVR можуть містити "протяжні HVR", як зазначені далі: 24-36 або 24-34 (L1), 46-56 або 50-56

(L2) і 89-97 або 89-96 (L3) у VL і 26-35 (H1), 50-65 або 49-65 (H2) і 93-102, 94-102 або 95-102 (H3) у VH. Залишки варіабельного домену пронумеровані згідно з Kabat et al., вище, для кожного з цих визначень.

Залишки "каркасної ділянки" або "FR" являють собою залишки варіабельного домену, відмінні від залишків HVR, визначених у даній заявці.

Термін "нумерація залишків варіабельного домену як у Kabat" або "нумерація амінокислотного положення як у Kabat" і його варіації стосуються системи нумерації, використовуваної для варіабельних доменів важкого ланцюга або для варіабельних доменів легкого ланцюга зборки антитіл як у Kabat et al., вище. З використанням даної системи нумерації, фактична лінійна амінокислотна послідовність може містити меншу кількість або додаткові амінокислоти, що відповідають укорочуванню або вставці в FR або HVR варіабельного домену. Наприклад, варіабельний домен важкого ланцюга може включати одиничну амінокислотну вставку (залишок 52a згідно з Kabat) після залишку 52 H2 і вставлені залишки (наприклад, залишки 82a, 82b і 82c, і т. д. згідно з Kabat) після залишку 82 FR важкого ланцюга. Нумерація залишків по Kabat може визначатися для даного антитіла за допомогою порівняння областей гомології послідовності антитіла з послідовністю зі "стандартною" нумерацією по Kabat.

Система нумерації Kabat, як правило, використовується при посиланні на залишки у варіабельному домені (приблизно залишки 1-107 легкого ланцюга і залишки 1-113 важкого ланцюга) (наприклад, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). "Система нумерації EU" або "індекс EU", як правило, використовується при посиланні на залишок у константній ділянці важкого ланцюга імуноглобуліну (наприклад, індекс EU, як опубліковано в Kabat et al., вище). "Індекс EU як у Kabat" стосується нумерації залишків людського антитіла IgG1 EU.

Експресія "лінійних антитіл" стосується антитіл, описаних у Zapata et al. (1995 Protein Eng, 8(10):1057-1062). Коротко, ці антитіла містять пари тандемних сегментів Fd (VH-CH1-VH-CH1), які разом з комплементарними поліпептидами легкого ланцюга утворюють пари антигензв'язувальних ділянок. Лінійні антитіла можуть бути біспецифічними або моноспецифічними.

При використанні в даній заявці, термін "специфічно зв'язується з" або "специфічний до" стосується вимірюваних і відтворюваних взаємодій, таких як зв'язування між мішенню й антитілом, що визначає присутність мішені в присутності гетерологічної популяції молекул, які включають біологічні молекули. Наприклад, антитіло, яке специфічно зв'язується з мішенню (яка може бути епітопом) являє собою антитіло, яке зв'язується з цією мішенню з більшою афінністю, авідністю, більш легко і/або з більшою тривалістю, ніж воно зв'язується з іншими мішеннями. В одному втіленні, ступінь зв'язування антитіла з чужою мішенню складає менше ніж приблизно 10% від зв'язування антитіла з мішенню, що виміряно, наприклад, за допомогою радіоімуноаналізу (RIA). У деяких втіленнях, антитіло, яке специфічно зв'язується з мішенню, має константу дисоціації (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ або $\leq 0,1$ нМ. У деяких втіленнях, антитіло специфічне зв'язується з епітопом на білку, який консервативний серед білків різних видів. В іншому втіленні, специфічне зв'язування може включати, але необов'язково, виключне зв'язування.

11. Композиції антитіл і їх одержання

Винахід додатково стосується стабільних водних композицій, які містять антитіло, таке як антитіло до PD-L1. У деяких втіленнях, композиція містить антитіло (наприклад, моноклональне антитіло), сахарозу, буфер і поверхнево-активну речовину, де композиція має рН, що складає приблизно від 5 приблизно до 7. У деяких втіленнях, антитіло (наприклад, антитіло до PD-L1, описане в даній заявці) у композиції складає приблизно від 40 мг/мл приблизно до 125 мг/мл. У деяких втіленнях, буфер являє собою гістидин (наприклад, ацетат гістидину) або ацетат натрію. У деяких втіленнях, буфер у композиції присутній в концентрації приблизно від 15 мМ приблизно до 25 мМ. У деяких втіленнях, сахароза присутня в композиції приблизно від 60 мМ приблизно до 180 мМ. У деяких втіленнях, поверхнево-активна речовина в композиції являє собою полісорбат (наприклад, полісорбат 20). У деяких втіленнях, полісорбат присутній у композиції в концентрації приблизно від 0,005% (мас./об.) приблизно до 0,06% (мас./об.). У деяких втіленнях, композиція має рН приблизно від 5 приблизно до 6,3. У деяких втіленнях, у даній заявці пропонується стабільна водна фармацевтична композиція, яка містить моноклональне антитіло до PD-L1 у концентрації приблизно від 40 мг/мл приблизно до 125 мг/мл, ацетат гістидину або ацетат натрію в концентрації приблизно від 15 мМ приблизно до 25 мМ, сахарозу в концентрації приблизно від 60 мМ приблизно до 240 мМ, полісорбат у концентрації приблизно від 0,005% (мас./об.) приблизно до 0,06% (мас./об.) і з рН приблизно від

5 приблизно до 6,3. У деяких втіленнях, композиція містить моноклональне антитіло до PD-L1 у кількості приблизно 125 мг/мл, сахарозу в концентрації приблизно 240 мМ, і рН композиції складає приблизно 5,5. У деяких втіленнях, композиція містить моноклональне антитіло до PD-L1 у кількості приблизно 60 мг/мл, сахарозу в концентрації приблизно 120 мМ, і рН композиції складає приблизно 5,8.

У деяких втіленнях, антитіло в композиції стабільне при -20 °C протягом щонайменше 6 місяців, щонайменше 12 місяців, щонайменше 18 місяців, щонайменше двох років, щонайменше трьох років або щонайменше чотирьох років. У деяких втіленнях, антитіло в композиції стабільне при 2-8 °C протягом щонайменше 6 місяців, щонайменше 12 місяців, щонайменше 18 місяців, щонайменше двох років або щонайменше трьох років. У деяких втіленнях, після зберігання антитіло зберігає щонайменше приблизно 60%, щонайменше приблизно 65%, щонайменше приблизно 70%, щонайменше приблизно 75%, щонайменше приблизно 80%, щонайменше приблизно 85%, щонайменше приблизно 90% або щонайменше приблизно 95% його біологічної активності (наприклад, зв'язування з мішенню або терапевтична ефективність), що виявляється до зберігання, тобто в момент приготування фармацевтичної композиції.

У деяких втіленнях, композиція стабільна приблизно при 40 °C протягом щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28 або більше днів. У деяких втіленнях, композиція стабільна приблизно при 40 °C протягом щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або більше тижнів. У деяких втіленнях, склад стабільний приблизно при 25 °C протягом щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 або більше місяців. У деяких втіленнях, склад стабільний приблизно при 5 °C протягом щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 або більше місяців. У деяких втіленнях, склад стабільний приблизно при -20 °C протягом щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 або більше місяців. У деяких втіленнях, склад стабільний приблизно при 5 °C або при -20 °C протягом щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 або більше місяців. Крім того, композиція переважно стабільна після заморожування (наприклад, при -20 °C, -40 °C або -70 °C) або розморожування композиції, наприклад після 1, 2, 3, 4 або 5 циклів заморожування і розморожування.

А. Антитіла (такі як антитіла до PD-L1)

У деяких втіленнях, антитіло композиції містить щонайменше один триптофан (наприклад, щонайменше два, щонайменше три або щонайменше чотири) у послідовності важкого або легкого ланцюга. У деяких втіленнях, амінокислота триптофан знаходиться в CDR-ділянках, у каркасних ділянках і/або в константних ділянках антитіла. У деяких втіленнях, антитіло містить два або три залишки триптофану в CDR-ділянках. У деяких втіленнях, антитіло в складі являє собою антитіло до PD-L1. PD-L1 (ліганд 1 білка 1 програмованої клітинної смерті), також відомий як PDL1, B7-H1, B7-4, CD274 і B7-H, являє собою трансмембранний білок, і його взаємодія з PD-1 інгібує Т-клітинну активацію і продукування цитокінів. У деяких втіленнях, антитіло до PD-L1, описане в даній заявці, зв'язується з людським PD-L1. Приклади антитіл до PD-L1, що можуть бути включені в композиції, описані в даній заявці, описані в патентній заявці WO 2010/077634 A1 і в US 8217149, що включені в дану заявку посиланням.

У деяких втіленнях, антитіло до PD-L1 здатне інгібувати зв'язування між PD-L1 і PD-1 і/або між PD-L1 і B7-1. У деяких втіленнях антитіло до PD-L1 являє собою моноклональне антитіло. У деяких втіленнях, антитіло до PD-L1 являє собою фрагмент антитіла, виділений із групи, що складається з фрагментів Fab, Fab'-SH, Fv, scFv і (Fab')₂. У деяких втіленнях, антитіло до PD-L1 являє собою гуманізоване антитіло. У деяких втіленнях, антитіло до PD-L1 являє собою людське антитіло.

Антитіла до PD-L1, описані в WO 2010/077634 A1 і в US 8217149, можуть бути включені до складу композицій, описаних у даній заявці. У деяких втіленнях, антитіло до PD-L1 містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:30, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:31.

В одному втіленні антитіло до PD-L1 містить поліпептид варіабельної ділянки важкого ланцюга, що містить послідовність HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де:

(а) послідовність HVR-H1 являє собою GFTFSX₁SWIH (SEQ ID NO:11);

(b) послідовність HVR-H2 являє собою AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO:12);

(c) послідовність HVR-H3 являє собою RHWPGGFDY (SEQ ID NO:13);

де додатково: X₁ являє собою D або G; X₂ являє собою S або L; X₃ являє собою T або S.

В одному аспекті, X₁ являє собою D; X₂ являє собою S і X₃ являє собою T. В іншому аспекті,

поліпептид додатково містить каркасні послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга, з'єднані між HVR відповідно до формули: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4). Ще в одному аспекті каркасні послідовності виділені з людських консенсусних каркасних послідовностей. У наступному аспекті каркасні послідовності являють собою консенсусну каркасну послідовність VH підгрупи III. Ще в одному аспекті, щонайменше одна з каркасних послідовностей являє собою наступну:

HC-FR1 являє собою EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:14);

HC-FR2 являє собою WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:15);

HC-FR3 являє собою RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:16);

HC-FR4 являє собою WGQGTTLVTVSA (SEQ ID NO:17).

Ще в одному аспекті, поліпептид важкого ланцюга додатково об'єднується з варіабельною ділянкою легкого ланцюга, що містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, де:

(a) послідовність HVR-L1 являє собою RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO:18);

(b) послідовність HVR-L2 являє собою SASX₉LX₁₀S (SEQ ID NO:19);

(c) послідовність HVR-L3 являє собою QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (SEQ ID NO:20);

де додатково: X₄ являє собою D або V; X₅ являє собою V або I; X₆ являє собою S або N; X₇ являє собою A або F; X₈ являє собою V або L; X₉ являє собою F або T; X₁₀ являє собою Y або A; X₁₁ являє собою Y, G, F або S; X₁₂ являє собою L, Y, F або W; X₁₃ являє собою Y, N, A, T, G, F або I; X₁₄ являє собою H, V, P, T або I; X₁₅ являє собою A, W, R, P або T.

Ще в одному аспекті, X₄ являє собою D; X₅ являє собою V; X₆ являє собою S; X₇ являє собою A; X₈ являє собою V; X₉ являє собою F; X₁₀ являє собою Y; X₁₁ являє собою Y; X₁₂ являє собою L; X₁₃ являє собою Y; X₁₄ являє собою H; X₁₅ являє собою A. Ще в одному аспекті, легкий ланцюг додатково містить каркасні послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга, з'єднані між HVR відповідно до формули: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Ще в одному аспекті каркасні послідовності виділені з людських консенсусних каркасних послідовностей. Ще в одному аспекті каркасні послідовності являють собою консенсусну каркасну послідовність VL каппа I. Ще в одному аспекті, щонайменше одна з каркасних послідовностей являє собою наступну:

LC-FR1 являє собою DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (SEQ ID NO:21);

LC-FR2 являє собою WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:22);

LC-FR3 являє собою GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:23);

LC-FR4 являє собою FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:24).

В іншому втіленні пропонується виділене антитіло до PD-L1 або антигензв'язувальний фрагмент, що містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга і легкого ланцюга:

(a) важкий ланцюг містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де додатково:

(i) послідовність HVR-H1 являє собою GFTFSX₁SWIH (SEQ ID NO:11);

(ii) послідовність HVR-H2 являє собою AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKGC (SEQ ID NO:12);

(iii) послідовність HVR-H3 являє собою RHWPGGFDY (SEQ ID NO:13);

(b) легкий ланцюг містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, де додатково:

(i) послідовність HVR-L1 являє собою RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO:18);

(ii) послідовність HVR-L2 являє собою SASX₉LX₁₀S (SEQ ID NO:19);

(iii) послідовність HVR-L3 являє собою QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (SEQ ID NO:20);

де додатково: X₁ являє собою D або G; X₂ являє собою S або L; X₃ являє собою T або S; X₄ являє собою D або V; X₅ являє собою V або I; X₆ являє собою S або N; X₇ являє собою A або F; X₈ являє собою V або L; X₉ являє собою F або T; X₁₀ являє собою Y або A; X₁₁ являє собою Y, G, F або S; X₁₂ являє собою L, Y, F або W; X₁₃ являє собою Y, N, A, T, G, F або I; X₁₄ являє собою H, V, P, T або I; X₁₅ являє собою A, W, R, P або T.

У конкретному аспекті, X₁ являє собою D; X₂ являє собою S і X₃ являє собою T. В іншому аспекті, X₄ являє собою D; X₅ являє собою V; X₆ являє собою S; X₇ являє собою A; X₈ являє собою V; X₉ являє собою F; X₁₀ являє собою Y; X₁₁ являє собою Y; X₁₂ являє собою L; X₁₃ являє собою Y; X₁₄ являє собою H; X₁₅ являє собою A. Ще в одному аспекті, X₁ являє собою D; X₂ являє собою S і X₃ являє собою T, X₄ являє собою D; X₅ являє собою V; X₆ являє собою S; X₇ являє собою A; X₈ являє собою V; X₉ являє собою F; X₁₀ являє собою Y; X₁₁ являє собою Y; X₁₂ являє собою L; X₁₃ являє собою Y; X₁₄ являє собою H і X₁₅ являє собою A.

Ще в одному аспекті, варіабельна ділянка важкого ланцюга містить одну або декілька каркасних послідовностей, з'єднаних між HVR типу: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), і варіабельні ділянки легкого ланцюга містять одну або декілька каркасних послідовностей, з'єднаних між HVR типу: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Ще в одному аспекті каркасні послідовності виділені з людських консенсусних каркасних послідовностей. Ще в одному аспекті, каркасні послідовності важкого

ланцюга виділені з послідовності Kabat підгрупи I, II або III. Ще в одному аспекті каркасна послідовність важкого ланцюга являє собою каркасну послідовність VH підгрупи III. Ще в одному аспекті, одна або декілька каркасних послідовностей важкого ланцюга являють собою наступні:

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO:14)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO:15)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:16)
HC-FR4	WGQGTTLVTVSA	(SEQ ID NO:17)

5

Ще в одному аспекті, каркасні послідовності легкого ланцюга виділені з послідовності Kabat каппа підгрупи I, II, II або IV. Ще в одному аспекті каркасна послідовність легкого ланцюга являє собою консенсусну каркасну послідовність VL каппа I. Ще в одному аспекті, одна або декілька каркасних послідовностей легкого ланцюга являють собою наступні:

10

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	(SEQ ID NO:21)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:22)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:23)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:24)

Ще в одному аспекті, антитіло додатково містить людську або мишачу константну ділянку. Ще в одному аспекті, людську константну ділянку вибирають із групи, що складається з IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Ще в одному окремому аспекті, людська константна ділянка являє собою IgG1. Ще в одному аспекті, мишачу константну ділянку вибирають із групи, що складається з IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Ще в одному аспекті мишача константна ділянка являє собою IgG2A. Ще в одному конкретному аспекті антитіло має ослаблену або мінімальну ефекторну функцію. Ще в одному конкретному аспекті, мінімальна ефекторна функція є результатом "безефекторної Fc-мутації" або аглікозилювання. Ще в одному втіленні, безефекторна Fc-мутація являє собою заміну N297A або D265A/N297A у константній ділянці.

15

20

Ще в одному втіленні пропонується антитіло до PD-L1, яке містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга і послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, де:

(а) важкий ланцюг додатково містить послідовність HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, що має щонайменше 85% ідентичності послідовності з GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:25), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:26) і з RHWPGGFDY (SEQ ID NO:13), відповідно, або

25

(b) легкий ланцюг додатково містить послідовність HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, що має щонайменше 85% ідентичності послідовності з RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:27), SASFLYS (SEQ ID NO:28) і з QQYLYHPAT (SEQ ID NO:29), відповідно.

У конкретному аспекті ідентичність послідовності складає 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або 100%. В іншому аспекті, варіабельна ділянка важкого ланцюга містить одну або декілька каркасних послідовностей, з'єднаних між HVR типу: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), і варіабельні ділянки легкого ланцюга містять одну або декілька каркасних послідовностей, з'єднаних між HVR типу: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Ще в одному аспекті каркасні послідовності виділені з людських консенсусних каркасних послідовностей. Ще в одному аспекті, каркасні послідовності важкого ланцюга виділені з послідовності Kabat підгрупи I, II або III. Ще в одному аспекті каркасна послідовність важкого ланцюга являє собою каркасну послідовність VH підгрупи III. Ще в одному аспекті, одна або декілька каркасних послідовностей важкого ланцюга являють собою наступні:

40

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO:14)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO:15)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:16)
HC-FR4	WGQGTTLVTVSA	(SEQ ID NO:17)

Ще в одному аспекті, каркасні послідовності легкого ланцюга виділені з послідовності Kabat каппа підгрупи I, II, II або IV. Ще в одному аспекті каркасна послідовність легкого ланцюга являє собою консенсусну каркасну послідовність VL каппа I. Ще в одному аспекті, одна або декілька каркасних послідовностей легкого ланцюга являють собою наступні:

45

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	(SEQ ID NO:21)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:22)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:23)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:24)

Ще в одному аспекті, антитіло додатково містить людську або мишачу константну ділянку. Ще в одному аспекті, людську константну ділянку вибирають із групи, що складається з IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Ще в одному окремому аспекті, людська константна ділянка являє собою IgG1. Ще в одному аспекті, мишачу константну ділянку вибирають із групи, що складається з IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Ще в одному аспекті мишача константна ділянка являє собою IgG2A. Ще в одному конкретному аспекті антитіло має ослаблену або мінімальну ефекторну функцію. Ще в одному конкретному аспекті, мінімальна ефекторна функція є результатом "безефекторної Fc-мутації" або аглікозилювання. Ще в одному втіленні, безефекторна Fc-мутація являє собою заміну N297A або D265A/N297A у константній ділянці.

Ще в одному втіленні пропонується виділене антитіло до PD-L1, яке містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга і послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, де:

(а) послідовність важкого ланцюга має щонайменше 85% ідентичності послідовності з послідовністю важкого ланцюга:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADS VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGGGTLVTVSA (SEQ ID NO:30), або

(b) послідовності легкого ланцюга мають щонайменше 85% ідентичності послідовності з послідовністю легкого ланцюга:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:31).

У конкретному аспекті ідентичність послідовності складає 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або 100%. В іншому аспекті, варіабельна ділянка важкого ланцюга містить одну або декілька каркасних послідовностей, з'єднаних між HVR типу: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), і варіабельні ділянки легкого ланцюга містять одну або декілька каркасних послідовностей, з'єднаних між HVR типу: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Ще в одному аспекті каркасні послідовності виділені з людських консенсусних каркасних послідовностей. Ще в одному аспекті, каркасні послідовності важкого ланцюга виділені з послідовності Kabat підгрупи I, II або III. Ще в одному аспекті каркасна послідовність важкого ланцюга являє собою каркасну послідовність VH підгрупи III. Ще в одному аспекті, одна або декілька каркасних послідовностей важкого ланцюга являють собою наступні:

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO:14)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO:15)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:16)
HC-FR4	WGQGTLVTVSA	(SEQ ID NO:17)

Ще в одному аспекті, каркасні послідовності легкого ланцюга виділені з послідовності Kabat каппа підгрупи I, II, II або IV. Ще в одному аспекті каркасна послідовність легкого ланцюга являє собою консенсусну каркасну послідовність VL каппа I. Ще в одному аспекті, одна або декілька каркасних послідовностей легкого ланцюга являють собою наступні:

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	(SEQ ID NO:21)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:22)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:23)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:24)

Ще в одному аспекті, антитіло додатково містить людську або мишачу константну ділянку. Ще в одному аспекті, людську константну ділянку вибирають із групи, що складається з IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Ще в одному окремому аспекті, людська константна ділянка являє собою IgG1. Ще в одному аспекті, мишачу константну ділянку вибирають із групи, що складається з IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Ще в одному аспекті мишача константна ділянка являє собою IgG2A. Ще в одному конкретному аспекті антитіло має ослаблену або мінімальну ефекторну функцію. Ще в одному аспекті, мінімальна ефекторна функція є результатом продукування в

прокаріотичних клітинах. Ще в одному конкретному аспекті, мінімальна ефекторна функція є результатом "безефекторної Fc-мутації" або аглікозилювання. Ще в одному втіленні, безефекторна Fc-мутація являє собою заміну N297A або D265A/N297A у константній ділянці.

5 Ще в одному втіленні пропонується виділене антитіло до PD-L1, яке містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга і послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, де:
(а) послідовність важкого ланцюга має щонайменше 85% ідентичності послідовності з послідовністю важкого ланцюга:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEWVAVWISPYGGSTYYADS
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGGQTLTVSS (SEQ ID
10 NO:32), або

(б) послідовності легкого ланцюга мають щонайменше 85% ідентичності послідовності з послідовністю легкого ланцюга:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:31).

15 У конкретному аспекті ідентичність послідовності складає 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або 100%. В іншому аспекті, варіабельна ділянка важкого ланцюга містить одну або декілька каркасних послідовностей, з'єднаних між HVR типу: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), і варіабельні ділянки легкого ланцюга містять одну або декілька каркасних послідовностей, з'єднаних між HVR типу:
20 (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Ще в одному аспекті каркасні послідовності виділені з людських консенсусних каркасних послідовностей. Ще в одному аспекті, каркасні послідовності важкого ланцюга виділені з послідовності Kabat підгрупи I, II або III. Ще в одному аспекті, каркасна послідовність важкого ланцюга являє собою каркасну послідовність VH підгрупи III. Ще в одному аспекті, одна або декілька каркасних послідовностей
25 важкого ланцюга являють собою наступні:

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO:14)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO:15)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:16)
HC-FR4	WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:33)

30 Ще в одному аспекті, каркасні послідовності легкого ланцюга виділені з послідовності Kabat каппа підгрупи I, II, II або IV. Ще в одному аспекті, каркасна послідовність легкого ланцюга являє собою консенсусну каркасну послідовність VL каппа I. Ще в одному аспекті, одна або декілька каркасних послідовностей легкого ланцюга являють собою наступні:

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO:21)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:22)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:23)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:24)

35 Ще в одному аспекті, антитіло додатково містить людську або мишачу константну ділянку. Ще в одному аспекті, людську константну ділянку вибирають із групи, що складається з IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Ще в одному окремому аспекті, людська константна ділянка являє собою IgG1. Ще в одному аспекті, мишачу константну ділянку вибирають із групи, що складається з IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Ще в одному аспекті мишача константна ділянка являє собою IgG2A. Ще в одному конкретному аспекті антитіло має ослаблену або мінімальну ефекторну функцію.
40 Ще в одному аспекті, мінімальна ефекторна функція є результатом продукування в прокаріотичних клітинах. Ще в одному конкретному аспекті, мінімальна ефекторна функція є результатом "безефекторної Fc-мутації" або аглікозилювання. Ще в одному втіленні, безефекторна Fc-мутація являє собою заміну N297A або D265A/N297A у константній ділянці.

45 Ще в одному аспекті, варіабельна ділянка важкого ланцюга містить одну або декілька каркасних послідовностей, з'єднаних між HVR типу: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), і варіабельні ділянки легкого ланцюга містять одну або декілька каркасних послідовностей, з'єднаних між HVR типу: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Ще в одному аспекті каркасні послідовності виділені з людських консенсусних каркасних послідовностей. Ще в одному аспекті, каркасні послідовності важкого ланцюга виділені з послідовності Kabat підгрупи I, II або III. Ще в одному аспекті, каркасна послідовність важкого ланцюга являє собою каркасну послідовність VH підгрупи III. Ще в одному
50 аспекті, одна або декілька каркасних послідовностей важкого ланцюга являють собою наступні:

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	(SEQ ID NO:34)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWVA	(SEQ ID NO:35)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:16)
HC-FR4	WGQGTLVTVSS	(SEQ ID NO:33)

- 5 Ще в одному аспекті, каркасні послідовності легкого ланцюга виділені з послідовності Kabat каппа підгрупи I, II, II або IV. Ще в одному аспекті каркасна послідовність легкого ланцюга являє собою консенсусну каркасну послідовність VL каппа I. Ще в одному аспекті, одна або декілька каркасних послідовностей легкого ланцюга являють собою наступні:

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO:21)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:22)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:23)
LC-FR4	FGQGTKVEIK	(SEQ ID NO:36)

- 10 Ще в одному аспекті, антитіло додатково містить людську або мишачу константну ділянку. Ще в одному аспекті, людську константну ділянку вибирають із групи, що складається з IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Ще в одному окремому аспекті, людська константна ділянка являє собою IgG1. Ще в одному аспекті, мишачу константну ділянку вибирають із групи, що складається з IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Ще в одному аспекті мишача константна ділянка являє собою IgG2A. Ще в одному конкретному аспекті антитіло має ослаблену або мінімальну ефекторну функцію.
- 15 Ще в одному конкретному аспекті, мінімальна ефекторна функція є результатом "безефекторної Fc-мутації" або аглікозилювання. Ще в одному втіленні, безефекторна Fc-мутація являє собою заміну N297A або D265A/N297A у константній ділянці.

- 20 Ще в одному втіленні пропонується антитіло до PD-L1, яке містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга і послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, де:
- (с) важкий ланцюг додатково містить послідовність HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, що має щонайменше 85% ідентичності послідовності з GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:4), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:5) і з RHWPGGFDY (SEQ ID NO:6), відповідно, або
- (d) легкий ланцюг додатково містить послідовність HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, що має щонайменше 85% ідентичності послідовності з RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:1), SASFLYS (SEQ ID NO:2) і QQYLYHPAT (SEQ ID NO:3), відповідно.
- 25

- У конкретному аспекті ідентичність послідовності складає 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або 100%. В іншому аспекті, варіабельна ділянка важкого ланцюга містить одну або декілька каркасних послідовностей, з'єднаних між HVR типу: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), і варіабельні ділянки легкого ланцюга містять одну або декілька каркасних послідовностей, з'єднаних між HVR типу: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Ще в одному аспекті каркасні послідовності виділені з людських консенсусних каркасних послідовностей. Ще в одному аспекті, каркасні послідовності важкого ланцюга виділені з послідовності Kabat підгрупи I, II або III. Ще в одному аспекті каркасна послідовність важкого ланцюга являє собою каркасну послідовність VH підгрупи III. Ще в одному аспекті, одна або декілька каркасних послідовностей важкого ланцюга являють собою наступні:
- 30
- 35

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO:34)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO:35)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:16)
HC-FR4	WGQGTLVTVSSASTK	(SEQ ID NO:33)

- 40 Ще в одному аспекті, каркасні послідовності легкого ланцюга виділені з послідовності Kabat каппа підгрупи I, II, II або IV. Ще в одному аспекті каркасна послідовність легкого ланцюга являє собою консенсусну каркасну послідовність VL каппа I. Ще в одному аспекті, одна або декілька каркасних послідовностей легкого ланцюга являють собою наступні:

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO:21)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:22)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:23)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:24)

Ще в одному аспекті, антитіло додатково містить людську або мишачу константну ділянку. Ще в одному аспекті, людську константну ділянку вибирають із групи, що складається з IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Ще в одному окремому аспекті, людська константна ділянка являє собою IgG1. Ще в одному аспекті, мишачу константну ділянку вибирають із групи, що складається з IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Ще в одному аспекті мишача константна ділянка являє собою IgG2A. Ще в одному конкретному аспекті антитіло має ослаблену або мінімальну ефекторну функцію. Ще в одному конкретному аспекті, мінімальна ефекторна функція є результатом "безефекторної Fc-мутації" або аглікозилювання. Ще в одному втіленні, безефекторна Fc-мутація являє собою заміну N297A або D265A/N297A у константній ділянці.

Ще в одному втіленні пропонується виділене антитіло до PD-L1, яке містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга і послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, де:

(а) послідовність важкого ланцюга має щонайменше 85% ідентичності послідовності з послідовністю важкого ланцюга:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEWVAVISPYGGSTYYADS
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGGGTLTVSSASTK (SEQ ID NO:8), або

(b) послідовності легкого ланцюга мають щонайменше 85% ідентичності послідовності з послідовністю легкого ланцюга:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:7).

У деяких втіленнях пропонується виділене антитіло до PD-L1, яке містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга і послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, де послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга має щонайменше 85%, щонайменше 86%, щонайменше 87%, щонайменше 88%, щонайменше 89%, щонайменше 90%, щонайменше 91%, щонайменше 92%, щонайменше 93%, щонайменше 94%, щонайменше 95%, щонайменше 96%, щонайменше 97%, щонайменше 98% або щонайменше 99% ідентичності послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:7. У деяких втіленнях пропонується виділене антитіло до PD-L1, яке містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга і послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, де послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга має щонайменше 85%, щонайменше 86%, щонайменше 87%, щонайменше 88%, щонайменше 89%, щонайменше 90%, щонайменше 91%, щонайменше 92%, щонайменше 93%, щонайменше 94%, щонайменше 95%, щонайменше 96%, щонайменше 97%, щонайменше 98% або щонайменше 99% ідентичності послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:8. У деяких втіленнях пропонується виділене антитіло до PD-L1, яке містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга і послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, де послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга має щонайменше 85%, щонайменше 86%, щонайменше 87%, щонайменше 88%, щонайменше 89%, щонайменше 90%, щонайменше 91%, щонайменше 92%, щонайменше 93%, щонайменше 94%, щонайменше 95%, щонайменше 96%, щонайменше 97%, щонайменше 98% або щонайменше 99% ідентичності послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:7, і послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга має щонайменше 85%, щонайменше 86%, щонайменше 87%, щонайменше 88%, щонайменше 89%, щонайменше 90%, щонайменше 91%, щонайменше 92%, щонайменше 93%, щонайменше 94%, щонайменше 95%, щонайменше 96%, щонайменше 97%, щонайменше 98% або щонайменше 99% ідентичності послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:8.

Ще в одному втіленні пропонується виділене антитіло до PD-L1, яке містить послідовність важкого ланцюга і послідовність легкого ланцюга, де:

(а) послідовність важкого ланцюга має щонайменше 85% ідентичності послідовності з послідовністю важкого ланцюга:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEWVAVISPYGGSTYYADS
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGGGTLTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:10), або

(b) послідовність легкого ланцюга має щонайменше 85% ідентичності послідовності з послідовністю легкого ланцюга:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG

LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:9).

У деяких втіленнях пропонується виділене антитіло до PD-L1, яке містить послідовність важкого ланцюга і послідовність легкого ланцюга, де послідовність легкого ланцюга має щонайменше 85%, щонайменше 86%, щонайменше 87%, щонайменше 88%, щонайменше 89%,
 5 щонайменше 90%, щонайменше 91%, щонайменше 92%, щонайменше 93%, щонайменше 94%, щонайменше 95%, щонайменше 96%, щонайменше 97%, щонайменше 98% або щонайменше 99% ідентичності послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:9. У деяких втіленнях пропонується виділене антитіло до PD-L1, яке містить послідовність важкого ланцюга і послідовність легкого ланцюга, де послідовність важкого ланцюга має щонайменше 85%,
 10 щонайменше 86%, щонайменше 87%, щонайменше 88%, щонайменше 89%, щонайменше 90%, щонайменше 91%, щонайменше 92%, щонайменше 93%, щонайменше 94%, щонайменше 95%, щонайменше 96%, щонайменше 97%, щонайменше 98% або щонайменше 99% ідентичності послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:10. У деяких втіленнях пропонується виділене антитіло до PD-L1, яке містить послідовність важкого ланцюга і послідовність легкого ланцюга, де послідовність легкого ланцюга має щонайменше 85%,
 15 щонайменше 86%, щонайменше 87%, щонайменше 88%, щонайменше 89%, щонайменше 90%, щонайменше 91%, щонайменше 92%, щонайменше 93%, щонайменше 94%, щонайменше 95%, щонайменше 96%, щонайменше 97%, щонайменше 98% або щонайменше 99% ідентичності послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:9, і послідовність важкого ланцюга має щонайменше 85%,
 20 щонайменше 86%, щонайменше 87%, щонайменше 88%, щонайменше 89%, щонайменше 90%, щонайменше 91%, щонайменше 92%, щонайменше 93%, щонайменше 94%, щонайменше 95%, щонайменше 96%, щонайменше 97%, щонайменше 98% або щонайменше 99% ідентичності послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:10.

У деяких втіленнях виділене антитіло до PD-L1 являє собою окислене моноклональне антитіло. У деяких втіленнях, окислене моноклональне антитіло в композиції містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:9, і важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10. У деяких втіленнях, окислене моноклональне антитіло в композиції містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10, де один або декілька з залишків W33, W50 або W101 є окисленими. У деяких втіленнях,
 25 окислене моноклональне антитіло в композиції містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10, де один або декілька з залишків M253 і M429 є окисленими. У деяких втіленнях, окислене моноклональне антитіло зберігає щонайменше приблизно 60%, щонайменше приблизно 65%, щонайменше приблизно 70%, щонайменше приблизно 75%, щонайменше приблизно 80%, щонайменше приблизно 85%, щонайменше
 30 приблизно 90% або щонайменше приблизно 95% його біологічної активності (наприклад, зв'язування з мішенню або терапевтична ефективність), що виявляється до зберігання, тобто в момент приготування фармацевтичної композиції.

У деяких втіленнях виділене антитіло до PD-L1 являє собою глікозиловане моноклональне антитіло. У деяких втіленнях, глікозиловане моноклональне антитіло в композиції містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:9, і важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10. У деяких втіленнях, глікозиловане моноклональне антитіло в композиції містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10, де один або декілька з залишків лізину є глікозованими. У деяких втіленнях,
 40 глікозиловане моноклональне антитіло в композиції містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10, де K65 є глікозованим.

У деяких втіленнях виділене антитіло до PD-L1 є аглікозованим.

У будь-якому з втілень даної заявки виділене антитіло до PD-L1 може зв'язуватися з людським PD-L1, наприклад з людським PD-L1, представленим у UniProtKB/Swiss-Prot реєстр. No.Q9NZQ7.1, або з його варіантом.

Ще в одному втіленні пропонується виділена нуклеїнова кислота, кодуєча будь-яке з антитіл, описаних у даній заявці. У деяких втіленнях, нуклеїнова кислота додатково містить вектор, придатний для експресії нуклеїнової кислоти, кодуєчої будь-яке з раніше описаних антитіл до PD-L1. Ще в одному додатковому аспекті, вектор присутній у клітині-хазяїні, придатній для експресії нуклеїнової кислоти. Ще в одному додатковому конкретному аспекті
 50 клітина-хазяїн являє собою еукаріотичну клітину або прокаріотичну клітину. Ще в одному додатковому конкретному аспекті еукаріотична клітина являє собою клітину ссавця, таку як клітина яєчників китайського хом'яка (CHO).

Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент можуть бути одержані методами, відомими в даній галузі, наприклад методом, який включає культивування клітини-хазяїна, що
 60 містить нуклеїнову кислоту, кодуєчу будь-яке з раніше описаних антитіл до PD-L1 або його

антигензв'язувальний фрагмент, у формі, придатній для експресії при умовах, придатних для продукування такого антитіла або його фрагмента і для витягання антитіла або його фрагмента.

В. Одержання антитіла

Антитіло в композиції одержують з використанням методів, доступних у даній галузі для генерації антитіл, деякі з таких зразкових методів описані в наступних розділах.

Антитіло спрямоване проти антигену, що представляє інтерес (тобто PD-L1, такого як людський PD-L1). Переважно, антиген являє собою біологічно важливий поліпептид, і введення антитіла ссавцю, що страждає на розлад, може в результаті приводити до терапевтичної користі для ссавця.

10 (i) Одержання антигену

Розчинні антигени або їх фрагменти, необов'язково кон'юговані з іншими молекулами, можуть використовуватися як імуногени для генерації антитіл. Для трансмембранних молекул, таких як рецептори, ці фрагменти (наприклад, позаклітинний домен рецептора) можуть використовуватися як імуноген. Альтернативно, клітини, експресуючі трансмембранну молекулу, можуть використовуватися як імуноген. Такі клітини можуть бути виділені з 15 натурального джерела (наприклад, пухлинних клітинних ліній) або можуть являти собою клітини, що трансформовані за допомогою рекомбінантних методів для експресії трансмембранної молекули. Інші антигени і їх форми, застосовувані для одержання антитіл, будуть очевидні для фахівців у даній галузі.

20 (ii) Деякі методи на основі антитіл

Поліклональні антитіла переважно виробляють у тварин за допомогою множини підшкірних (sc) або внутрішньоочеревинних (ip) ін'єкцій відповідного антигену й ад'юванту. Це може бути корисно для кон'югації відповідного антигену з білком, що є імуногенним у виді тварини, яку імунізують, наприклад гемоціанін лімфи равлика, сироватковий альбумін, бичачий тироглобулін або соєвий інгібітор трипсину, з використанням біфункціонального або модифікованого агента, 25 наприклад малеїмідобензоїлсульфосукцинімідного ефіру (кон'югація через залишки цистеїну), N-гідроксисукциніміду (через залишки лізіну), глутаральдегіду, бурштинового ангідриду, SOCl_2 або $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, де R і R^1 являють собою різні алкільні групи.

Тварин імунізують проти антигену, імуногенних кон'югатів або їх похідних шляхом об'єднання, наприклад, 100 мкг або 5 мкг білка або кон'югата (для кроликів або мишей, відповідно) з використанням 3 об'ємів повного ад'юванту Фрейнда і шляхом внутрішньошкірної ін'єкції розчину в множину сайтів. Через один місяць тварин повторно імунізують з використанням 1/5-1/10 від вихідної кількості пептиду або кон'югата в повному ад'юванті Фрейнда за допомогою підшкірної ін'єкції в множину сайтів. Через 7-14 днів у тварин проводять 35 забір крові й аналізують сироватку на предмет антитільного титру. Тварин імунізують доти, поки значення титру не вийде на плато. Переважно, тварину імунізують з використанням кон'югата того ж антигену, але кон'югованого з іншим білком і/або за допомогою перекреснозв'язувального реагенту. Кон'югати також можуть бути одержані в рекомбінантній клітинній культурі у вигляді білкових химер. Крім того, агрегуючі агенти, такі як алюм, придатні 40 для використання для посилення імунної відповіді.

Моноклональні антитіла за винаходом можуть бути одержані з використанням гібридомного методу, вперше описаного Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), і додатково описані, наприклад, у Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3):253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), і в Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006), стосовно гібридом людина-людина. Додаткові методи включають описані, наприклад, у пат. США № 7189826, що стосується одержання моноклональних людських натуральних антитіл IgM з гібридомних клітинних ліній. Технологія людської гібридоми (технологія Тріюми) описана в Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005), і Vollmers and 50 Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

Для інших різних гібридомних методів див., наприклад, US 2006/258841; US 2006/183887 (повністю людські антитіла), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229 і пат. США №№ 7078492 і 7153507. Наведений як приклад протокол одержання моноклональних антитіл з використанням гібридомного методу докладно описаний нижче. В 55 одному втіленні, мишу або іншу придатну тварину-хазяїна, таку як хом'як, імунізують, щоб витягти лімфоцити, які продукують або здатні продукувати антитіла, що будуть специфічно зв'язуватися з білком, використовуваним для імунізації. Антитіла виробляються у тварин за допомогою множини підшкірних (sc) або внутрішньоочеревинних (ip) ін'єкцій поліпептиду за винаходом або його фрагмента і ад'юванту, такого як монофосфорилипід А (MPL)/трегалози дикриноміколат (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Гамільтон, Монтана.). Поліпептид за 60

винаходом (наприклад, антиген) або його фрагмент може бути одержаний з використанням методів, добре відомих у даній галузі, таких як рекомбінантні методи, деякі з яких додатково описані в даній заявці. Сироватку з імунізованих тварин аналізують на предмет антитіл до антигену і необов'язково проводять бустерні імунізації. Виділяють лімфоцити з тварин, продукуючих антитіла до антигену. Альтернативно, лімфоцити можуть імунізувати *in vitro*.

Лімфоцити потім зливають з мієломними клітинами з використанням придатного агента злиття, такого як поліетиленгліколь, з утворенням гібридомної клітини. Див., наприклад, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986). Можуть використовуватися мієломні клітини, які ефективно зливаються, підтримують стабільний високий рівень продукування антитіла вибраними антитілопродукуючими клітинами, і які є чутливими до середовища, такого як середовище HAT. Типові мієломні клітини включають, зокрема, такі як ті, що виділені з мишачих пухлин MOPC-21 і MPC-11, доступних з центру розподілу клітин Інституту Солка, Сан Дієго, Каліфорнія, США, і клітини SP-2 або X63-Ag8-653, доступні з Американської Типованої Колекції Клітинних Культур, Роквілл, Меріленд, США. Людські мієломні і гетеромієломні клітинні лінії людина-миша також описані для продукування людських моноклональних антитіл (Kozbor, J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Одержані таким чином гібридомні клітини висівають і вирощують у придатному культуральному середовищі, яке, наприклад, містить одну або декілька речовин, що інгібують ріст або виживаність незлитих, батьківських мієломних клітин. Наприклад, якщо батьківські мієломні клітини позбавлені ферменту гіпоксантигуанінфосфорибозилтрансферази (HGPRT або HPRT), то культуральне середовище для гібридом, як правило, буде включати гіпоксантин, аміноптерин і тимідин ("HAT-середовище"), речовини, які запобігають росту дефіцитних по HGPRT клітин. Переважно, безсироваткові культуральні методи одержання гібридом використовуються для зменшення застосування виділеної з тварин сироватки, такої як фетальна бичача сироватка, як описано, наприклад, у Even et al., *Trends in Biotechnology*, 24(3), 105-108 (2006).

Олігопептиди у вигляді засобу для поліпшення продуктивності гібридомних клітинних культур описані, наприклад у Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005). Конкретно, стандартне культуральне середовище збагачується конкретними амінокислотами (аланін, серин, аспарагін, пролін) або фракціями білкових гідролізатів, і де апоптоз може значно пригнічуватися синтетичними олігопептидами, що складаються з амінокислотних залишків у кількості від трьох до шести. Пептиди присутні в мілімолярних або в більш високих концентраціях.

Культуральне середовище, у якому ростуть гібридомні клітини, може бути проаналізоване на предмет продукування моноклональних антитіл, що зв'язуються з антитілом за винаходом. Специфічність зв'язування моноклональних антитіл, продукованих гібридомними клітинами, може бути визначена імунопреципітацією або за допомогою *in vitro* аналізу зв'язування, такого як радіоімунний аналіз (PIA) або імуноферментний аналіз (ІФА). Афіність зв'язування моноклонального антитіла може бути визначена, наприклад, за допомогою аналізу Скетчарда. Див., наприклад, Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Після ідентифікації гібридомних клітин, що продукують антитіла з цільовою специфічністю, афіністю і/або активністю, клони можуть бути субклоновані процедурою лімітуючих розведень і вирощені стандартними способами. Див., наприклад, Goding, вище. Придатні культуральні середовища для цих цілей включають, наприклад, середовище D-MEM або RPMI-1640. Крім того, гібридомні клітини можуть бути вирощені *in vivo* у вигляді асцитних пухлин у тварин. Моноклональні антитіла, секретовані субклонами, відділяють придатним способом від культурального середовища, асцитної рідини або сироватки звичайними способами очищення імуноглобулінів, такими як, наприклад, на сефарозі з протеїном А, гідроксилапатитна хроматографія, гель-електрофорез, діаліз або афінна хроматографія. Одна з процедур виділення білків з гібридомних клітин описана в US 2005/176122 і в пат. США № 6919436. Метод включає використання мінімальних солей, таких як ліотропні солі, у процесі зв'язування, а також переважне використання невеликих кількостей органічних розчинників у процесі елюювання.

(iii) Деякі методи скринінгу бібліотек

Антитіла за винаходом можуть бути одержані з використанням комбінаторних бібліотек для скринінгу на предмет пошуку антитіл з цільовою активністю або активностями. Наприклад, у даній галузі відома множина методів генерації бібліотек фагового дисплея і скринінгу таких бібліотек на предмет пошуку антитіл, що мають цільові характеристики зв'язування. Такі методи описані загалом Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology*, 178:1-37 (O'Brien et al., ed.,

Human Press, Totowa, N.J., 2001). Наприклад, один з методів генерації антитіл, що представляють інтерес, здійснюють шляхом застосування фагової бібліотеки антитіл, як описано в Lee et al., *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93.

Загалом, клони синтетичних антитіл селектують шляхом скринінгу фагових бібліотек, які містять фаг, що експонує різні фрагменти варіабельної ділянки антитіла (Fv), зшиті з оболонковим білком фага. Такі фагові бібліотеки готують за допомогою афінної хроматографії проти цільового антигену. Клони, експресуючі фрагменти Fv, здатні зв'язуватися з цільовим антигеном, адсорбуються на антиген і, таким чином, відділяються від клонів бібліотеки, що не зв'язалися. Клони, що зв'язалися, потім елюють з антигену і можуть додатково збагачувати за допомогою додаткових циклів адсорбції антигену/елювання. Будь-яке з антитіл за винаходом може бути одержане шляхом дизайну придатної процедури антигенного скринінгу для селекції фагового клону, що представляє інтерес, з наступним конструюванням клону повнорозмірного антитіла з використанням послідовностей Fv з фагового клону, що представляє інтерес, і придатних послідовностей константної ділянки (Fc), описаних у Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md. (1991), vols. 1-3.

У деяких втіленнях, антигензв'язувальний домен антитіла утворюється з двох варіабельних ділянок (V) приблизно по 110 амінокислот, одна із яких з легкого ланцюга (VL), а інша з важкого ланцюга (VH), які обидві представляють три гіперваріабельні петлі (HVR) або ділянки, що визначають комплементарність (CDR). Варіабельні домени можуть функціонально експонуватися на фагу або у вигляді одноланцюжкових фрагментів Fv (scFv), у яких VH і VL ковалентно зв'язані за допомогою короткого, гнучкого пептиду, або у вигляді фрагментів Fab, де кожний з них зшитий з константним доменом і взаємодіє нековалентно, як описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). При використанні в даній заявці, фагові клони, кодує scFv, і фагові клони, кодує Fab, разом належать до "фагових клонів Fv" або "Fv-клонів".

Репертуари генів VH і VL можуть окремо клонуватися за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і піддаватися випадковій рекомбінації у фагових бібліотеках, які потім можуть використовуватися для пошуку антигензв'язувальних клонів, як описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). Бібліотеки з імунізованих джерел забезпечують високоафінні антитіла відносно імуногена без необхідності конструювання гібридом. Альтернативно, наївний репертуар може клонуватися з одержанням єдиного джерела людських антитіл із широким спектром чужих, а також власних антигенів без якої-небудь імунізації, як описано в Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Нарешті, наївні бібліотеки також можуть бути одержані синтетично шляхом клонування неперетасованих сегментів V-гена зі стовбурових клітин і шляхом використання ПЛР-праймерів, що містять випадкові послідовності, для кодування високоваріабельних ділянок CDR3 і для досягнення перебудови *in vitro*, як описано в Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992).

У деяких втіленнях, нитковидний фаг використовується для експонування фрагментів антитіл шляхом зшивання з міноним оболонковим білком pIII. Фрагменти антитіл можуть експонуватися у вигляді одноланцюжкових фрагментів Fv, у яких домени VH і VL з'єднані на одному поліпептидному ланцюзі за допомогою гнучкого поліпептидного спейсера, наприклад, як описано в Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), або фрагментів Fab, у яких один ланцюг зшитий з pIII, а інший секретується в периплазматичний простір бактеріальної клітини-хазяїна, де відбувається збирання структури Fab-оболонкового білка, що починає експонуватися на фаговій поверхні шляхом заміщення якогось з оболонкових білків дикого типу, наприклад, як описано в Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19:4133-4137 (1991).

Загалом, нуклеїнові кислоти, кодує фрагменти генів антитіл, одержують з імунних клітин людей або тварин. Якщо доцільно одержати бібліотеку з клонами антитіл до визначених антигенів, то об'єкта імунізують за допомогою антигену для генерації антитільної відповіді і витягають клітини селезінки і/або циркулює В-клітини або інші лімфоцити периферичної крові (PBL) для конструювання бібліотеки. В одному втіленні, одержували бібліотеку фрагментів генів антитіл із клонів антитіл до антигенів шляхом генерації антитільної відповіді на антиген у трансгенних мишах, що несуть набір функціональних генів імуноглобулінів людини (і позбавлені системи продукування функціональних ендогенних антитіл), так що імунізація антигеном породжувала В-клітини, продукує людські антитіла проти антигену. Генерація трансгенних мишей, продукує людські антитіла, описана нижче.

Можна одержати додаткове збагачення клітинної популяції, реактивної проти антигену, шляхом використання придатної процедури скринінгу для виділення В-клітин, експресуючих антигенспецифічне мембранно-зв'язане антитіло, наприклад, за допомогою поділу клітин за

допомогою антигенної афінної хроматографії або адсорбції клітин на мічений флуорохромом антиген з наступною проточною цитометрією (FACS).

Альтернативно, використання клітин селезінки і/або В-клітин або інших PBL з неімунізованого донора забезпечує кращу репрезентативність можливого антитільного репертуару, а також дає можливість конструювання бібліотеки антитіл з використанням будь-якого виду тварин (людини або іншої тварини), у якому антиген не є антигенним. Для бібліотек, що включають *in vitro* конструкцію генів антитіл, у об'єкта проводять забір стовбурових клітин для одержання нуклеїнових кислот, кодуючих сегменти неперетасованих генів антитіл. Імунні клітини, що представляють інтерес, можуть бути одержані з множини видів тварин, таких як людина, миша, щур, заячі, вовчі, собачі, котяті, свиня, велика рогата худоба, конячі і види птахів і т. д.

Нуклеїнову кислоту, кодуючу сегменти варіабельних генів антитіла (включаючи сегменти VH і VL), витягають із клітин, що представляють інтерес, і ампліфікують. У випадку бібліотек перетасованих генів VH і VL, цільова ДНК може бути одержана шляхом виділення ДНК або РНК із лімфоцитів з наступною полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР) з праймерами на 5'- і 3'-кінці перетасованих генів VH і VL, як описано в Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:3833-3837 (1989), одержуючи таким чином різні репертуари генів V для експресії. Гени V можуть ампліфікуватися з кДНК або з геномною ДНК зі зворотними праймерами на 5'-кінець екзона, кодуючого зрілий V-домен, і прямими праймерами на внутрішню область J-сегмента, як описано в Orlandi et al. (1989) and in Ward et al., Nature, 341:544-546 (1989). Однак для ампліфікації з кДНК зворотні праймери також можуть бути зроблені на основі лідерного екзона, як описано в Jones et al., Biotechnol., 9:88-89 (1991), а прямі праймери знаходяться усередині константної ділянки, як описано в Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:5728-5732 (1989). Для максимуму комплементарності, виродженість може бути включена в праймери, як описано в Orlandi et al. (1989) або Sastry et al. (1989). У деяких втіленнях, різноманітність бібліотеки максимізується шляхом використання ПЛР-праймерів для кожного сімейства V-генів з метою ампліфікації всіх доступних конфігурацій VH і VL, присутніх у зразку нуклеїнової кислоти імунної клітини, наприклад, як описано в методі Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), або як описано в методі Orum et al., Nucleic Acids Res., 21:4491-4498 (1993). Для клонування ампліфікованої ДНК у експресуючому векторі, рідкі рестрикційні сайти можуть бути введені усередину ПЛР-праймерів у вигляді мітки на одному кінці, як описано в Orlandi et al. (1989), або шляхом додаткової ПЛР-ампліфікації з міченим праймером, як описано в Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991).

Репертуари синтетично перетасованих V-генів можуть бути виділені *in vitro* з сегментів V-генів. Більшість сегментів людських VH-генів прокловані й відсеквеновані (опубліковано в Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227:776-798 (1992)), а також прокартвані (опубліковано в Matsuda et al., Nature Genet., 3:88-94 (1993)); ці клоновані сегменти (що включають всі головні конформації H1- і H2-петлі) можуть використовуватися для генерації різноманітних репертуарів VH-генів з використанням ПЛР-праймерів, кодуючих H3-петлі множини послідовностей і множини розмірів, як описано в Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992). VH-репертуари також можуть бути одержані з використанням усієї різноманітності послідовностей, сфокусованої в довгій H3-петлі єдиного розміру, як описано в Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457-4461 (1992). Людські сегменти Vk і VL були прокловані й відсеквеновані (опубліковано в Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23:1456-1461 (1993)) і можуть використовуватися для одержання синтетичних репертуарів легкого ланцюга. Синтетичні репертуари V-генів на основі діапазону збірок VH і VL, а також розмірів L3 і H3 будуть кодувати антитіла передбачуваної структурної різноманітності. Після ампліфікації ДНК, кодуючої V-гени, сегменти зародкових V-генів можуть бути перетасовані *in vitro* відповідно до методів Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992).

Репертуари фрагментів антитіл можуть бути сконструйовані шляхом об'єднання разом репертуарів генів VH і VL декількома способами. Кожен репертуар може бути створений у різних векторах, і вектори рекомбінують *in vitro*, наприклад, як описано в Hogrefe et al., Gene, 128:119-126 (1993), або *in vivo* за допомогою комбінаторної інфекції, наприклад за допомогою loxP-системи, описаної в Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21:2265-2266 (1993). Спосіб *in vivo* рекомбінації використовує дволанцюжкові натуральні фрагменти Fab для подолання межі розміру бібліотеки, що накладається ефективністю трансформації *E. coli*. Наївні репертуари VH і VL клонують окремо, один у фагмідний, а інший у фаговий вектор. Потім дві бібліотеки об'єднують за допомогою фагової інфекції бактерій, що містять фагміди, так, щоб кожна клітина містила відмінну комбінацію, і тоді розмір бібліотеки обмежується тільки кількістю присутніх клітин (приблизно 10^{12} клонів). Обидва вектори містять *in vivo* сигнали рекомбінації так, щоб

гени VH і VL рекомбінували на єдиному репліконі і разом упаковувалися у фагові віріони. Ці величезні бібліотеки забезпечують велику кількість різних антитіл гарної афінності (K_d^{-1} приблизно 10^{-8} M).

Альтернативно, репертуари можуть клонуватися послідовно в той же вектор, як описано в Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991), або можуть збиратися разом за допомогою ПЛР і потім клонуватися, наприклад, як описано в Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991). ПЛР-збирання також може використовуватися для з'єднання ДНК VH і VL разом із ДНК, кодуєчою гнучкий пептидний спейсер, з утворенням одноланцюжкових репертуарів Fv (scFv). Ще в одному методі, "ПЛР-збирання в клітині" використовують для об'єднання генів VH і VL усередині лімфоцитів за допомогою ПЛР і потім клонують репертуари зв'язаних генів, як описано в Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20:3831-3837 (1992).

Антитіла, вироблені наївними бібліотеками (або натуральні, або синтетичні), можуть бути помірної афінності (K_d^{-1} приблизно 10^6 - 10^7 M $^{-1}$), але дозрівання афінності також може імітуватися in vitro шляхом конструювання бібліотеки або повторної селекції з вторинних бібліотек, як описано в Winter et al. (1994), вище. Наприклад, може вводитися випадкова мутація in vitro шляхом застосування полімерази зниженої точності (опубліковано в Leung et al., Technique 1:11-15 (1989)) у методі Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992) або в методі Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:3576-3580 (1992). Крім того, дозрівання афінності може здійснюватися за допомогою введення випадкової мутації однієї або декількох CDR, наприклад, з використанням ПЛР із праймерами, що несуть випадкову послідовність, яка охоплює CDR, що представляє інтерес, в вибрані індивідуальні клони Fv, і шляхом скринінгу на предмет пошуку клонів з більш високою афінністю. WO 9607754 (опубліковано 14 березня 1996) описує спосіб індукції мутагенезу в ділянці, що визначає комплементарність, легкого ланцюга імуноглобуліну зі створенням бібліотеки генів легкого ланцюга. Інший ефективний спосіб являє собою рекомбінацію доменів VH або VL, вибраних за допомогою фагового дисплея, разом з репертуарами природних варіантів домену V, одержаних з імунізованих донорів, і скринінг на предмет пошуку більш високої афінності з використанням декількох раундів перетасування ланцюга, як описано в Marks et al., Biotechnol., 10:779-783 (1992). Даний метод дає можливість продукування антитіл і фрагментів антитіл з афінностями, що складають приблизно 10^{-9} M або менше.

Скринінг бібліотек може здійснюватися за допомогою множини методів, відомих у даній галузі. Наприклад, антиген може використовуватися для покриття ямок адсорбуючих планшетів, може експресуватися на клітинах-хазяїнах, прикріплених на адсорбуючих планшетах, або може використовуватися в клітинному сортигу, або може кон'югуватися з біотином для захоплення з використанням покритих стрептавідином гранул, або може використовуватися в будь-якому іншому методі для приготування бібліотек фагового дисплея.

Зразки фагової бібліотеки контактують з іммобілізованим антигеном при умовах, придатних для зв'язування щонайменше частини фагових частинок з адсорбентом. Звичайно умови, що включають рН, іонну силу, температуру і т. п., вибирають для імітації фізіологічних умов. Фаги, зв'язані з твердою підкладкою, промивають і потім елюють з використанням кислоти, як, наприклад, описано в Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991), або з використанням лугу, як, наприклад, описано в Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), або за допомогою антигенної конкуренції, як, наприклад, у процедурі, аналогічній методу антигенної конкуренції Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991). Фаги можуть бути збагачені в 20-1000 разів за один раунд селекції. Крім того, збагачені фаги можуть рости в бактеріальній культурі і можуть піддаватися додатковим раундам селекції.

Ефективність селекції залежить від багатьох факторів, що включають кінетику дисоціації під час промивання, а також відповідь на питання, чи може множина фрагментів антитіл на єдиному фагу одночасно контактувати з антигеном. Антитіла зі швидкою кінетикою дисоціації (і зі слабкою афінністю зв'язування) можуть утримуватися шляхом застосування коротких промивань, полівалентного фагового дисплея і високої густини покриття антигену на твердій підкладці. Висока густина не тільки стабілізує фаг за допомогою полівалентної взаємодії, але і сприяє повторному зв'язуванню фага, що дисоціював. Селекція антитіл з повільною кінетикою дисоціації (і гарною афінністю зв'язування) може стимулюватися шляхом використання тривалих промивань і моновалентного фагового дисплея, як описано в Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990), і в WO 92/09690, і з використанням низької густини покриття антигену, як описано в Marks et al., Biotechnol., 10:779-783 (1992).

Можливий вибір між фаговими антитілами до антигену з різними афінностями, навіть з афінностями, що відрізняються незначно. Однак випадкова мутація вибраного антитіла (наприклад, як у деяких методах з дозріванням афінності) ймовірно породить множину мутацій,

більшість зі зв'язуванням з антигеном і деякі з більш високою афінністю. При обмеженні антигеном рідкий фаг з високою афінністю може бути конкурентним. Для зберігання мутантів з більш високою афінністю фаги можуть інкубуватися з надлишком біотинільованого антигену при концентрації, яка нижче, ніж цільова молярна константа для антигенної афінності. Фаги з високою афінністю зв'язування можуть потім захоплюватися за допомогою парамагнітних гранул, покритих стрептавідином. Таке "рівноважне захоплення" дає можливість антитілам селектуватися згідно з їх афінностями зв'язування з чутливістю, яка дозволяє виділення мутантних клонів з настільки маленькою афінністю, як, наприклад, із дворазовим перевищенням афінності з високого надлишку фагів з більш низькою афінністю. Умови, використовувані для промивання фагів, зв'язаних із твердою підкладкою, також можуть регулюватися на основі кінетики дисоціації.

Клони антитіл до антигенів можуть бути селектовані на основі їх активності. У деяких втіленнях, у винаході пропонуються антитіла до антигенів, що зв'язуються з живими клітинами, які у природних умовах експресують антиген, або зв'язуються з вільноплаваючим антигеном або з антигеном, прикріпленим до інших клітинних структур. Клони Fv, що відповідають таким антитілам до антигенів, можуть бути вибрані за допомогою (1) виділення клонів антитіл до антигенів з фагової бібліотеки, як описано вище, і, необов'язково, ампліфікації виділеної популяції фагових клонів шляхом вирощування популяції в придатному бактеріальному хазяїні; (2) вибору антигену і другого білка, проти якого доцільна блокуюча і неблокуюча активність, відповідно; (3) адсорбції фагових клонів антитіл до антигену на іммобілізований антиген; (4) використання надлишку другого білка для елюювання будь-яких небажаних клонів, що розпізнають антигензв'язувальні детермінанти, які перекривають або спільно використовуються зв'язувальними детермінантами другого білка; і (5) елюювання клонів, що залишилися адсорбованими після стадії (4). Необов'язково, клони з цільовими властивостями блокування/розблокування можуть бути додатково збагачені шляхом одного або декількох повторень процедур селекції, описаних у даній заявці.

ДНК, кодуєчі моноклональні антитіла, виділені з гібридом, або Fv-клони фагового дисплея за винаходом легко виділяються з використанням стандартних процедур (наприклад, з використанням олігонуклеотидних праймерів, розроблених для специфічної ампліфікації кодуєчих ділянок важкого і легкого ланцюгів, що представляють інтерес, з гібридом або ДНК-матриць фага). Після виділення ДНК може поміщатися в експресуючі вектори, які потім трансформують у клітини-хазяїни, такі як клітини *E. coli*, мавпячі клітини COS, клітини яєчників китайського хом'яка (CHO) або клітини мієломи, які без цього не виробляють білок імуноглобуліну, для одержання синтезу моноклональних антитіл у рекомбінантних клітинах-хазяїнах. Оглядові статті по рекомбінантній експресії в бактеріях ДНК, кодуєчої антитіло, включають Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256 (1993), і Pluckthun, Immunol. Revs, 130:151 (1992).

ДНК, кодуєчі Fv-клони за винаходом, можуть об'єднуватися з відомими ДНК-послідовностями, кодуєчими константні ділянки важкого і/або легкого ланцюга (наприклад, відповідні ДНК-послідовності можуть бути одержані з Kabat et al., вище), з утворенням клонів, кодуєчих повнорозмірний або неповний важкий і/або легкий ланцюг. Зрозуміло, що константні ділянки будь-якого ізотипу можуть використовуватися для даної мети, включаючи константні ділянки IgG, IgM, IgA, IgD і IgE, і що такі константні ділянки можуть бути одержані з людини або з будь-якого виду тварини. Fv-клон, виділений із ДНК варіабельного домену одного виду тварини (такого як людина) і потім зшитий із ДНК константної ділянки іншого виду тварини з утворенням кодуєчої послідовності "гібриду", повнорозмірний важкий ланцюг і/або легкий ланцюг включений у визначення "химерне" і "гібридне" антитіло, відповідно до даної заявки. У деяких втіленнях, Fv-клон, виділений з людської варіабельної ДНК, зшивається з ДНК людської константної ділянки з утворенням кодуєчої послідовності для повнорозмірного або неповного людського важкого і/або легкого ланцюга.

ДНК, кодуєча антитіло до антигену, виділене з гібридами за винаходом, також може бути модифікована, наприклад, шляхом заміни кодуєчої послідовності константних доменів людського важкого і легкого ланцюгів замість гомологічних мишачих послідовностей, виділених з гібридного клону (наприклад, як у методі Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). ДНК, кодуєча антитіло або його фрагмент, виділене з гібридами або з Fv-клону, може бути додатково модифікована шляхом ковалентного зв'язку з кодуєчою послідовністю імуноглобулінів з повною або з неповною кодуєчою послідовністю поліпептиду - неімуноглобуліну. Таким способом одержують "химерні" або "гібридні" антитіла, що мають високу специфічність зв'язування антитіл за винаходом, виділених з Fv-клону або з гібридного клону.

(iv) Гуманізовані і людські антитіла

Різні методи гуманізації антитіл тваринного походження добре відомі в даній галузі. Наприклад, гуманізоване антитіло має один або декілька амінокислотних залишків, введених у нього з джерела, що не є людиною. Амінокислотні залишки з джерела, що не є людиною, часто називаються імпортованими залишками, які, як правило, беруться з "імпортуючого" варіабельного домену. Гуманізація може бути по суті проведена відповідно до методу Winter і співавторів (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)) шляхом заміни послідовностей CDR або послідовності CDR гризунів на відповідні послідовності людського антитіла. Відповідно, такі "гуманізовані" антитіла є химерними антитілами (пат. США № 4816567), де по суті замінили менше ніж інтактний варіабельний домен відповідною послідовністю з виду, відмінного від людини. На практиці, гуманізовані антитіла як правило є людськими антитілами, у яких деякі залишки в CDR і можливо деякі залишки FR замінені на аналогічні ділянки в антитілах гризунів.

Вибір людських варіабельних доменів, як легкого, так і важкого ланцюга, використовуваних в одержанні гуманізованих антитіл, дуже важливий для зменшення антигенності. Згідно з так званим методом "найкращої відповідності" послідовність варіабельного домену антитіла гризуна скринуються проти всієї бібліотеки послідовностей варіабельних доменів людини. Потім людську послідовність, яка найбільш близька до послідовності гризуна, приймають як людську каркасну послідовність (FR) для гуманізованого антитіла (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). В іншому методі використовується конкретний каркас, виділений з консенсусної послідовності для всіх людських антитіл конкретної підгрупи легких або важких ланцюгів. Той же каркас може використовуватися для деяких інших гуманізованих антитіл (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Додатково важливо, щоб антитіла були гуманізованими зі збереженням афінності до антигену і зі збереженням інших переважних біологічних властивостей. Для досягнення даної мети відповідно до одного з втілень способу, гуманізовані антитіла одержують способом аналізу батьківських послідовностей і різних концептуальних похідних гуманізованих антитіл за допомогою тривимірних моделей батьківської і гуманізованої послідовностей. Тривимірні імуноглобулінові моделі широко доступні і добре знайомі фахівцям у даній галузі. Доступні комп'ютерні програми, які ілюструють і відображають можливі тривимірні конформаційні структури вибраних кандидатних імуноглобулінових послідовностей. Перегляд цих виведених даних дозволяє аналізувати ймовірну роль деяких залишків у функціонуванні кандидатної імуноглобулінової послідовності, тобто проводити аналіз залишків, що впливають на здатність кандидатного імуноглобуліну зв'язуватися з антигеном. Таким чином, FR-залишки можуть бути вибрані й об'єднані з реципієнта й імпортованих послідовностей так, щоб досягалася цільова характеристика антитіла, така як підвищена афінність до цільового антигену. Загалом, залишки гіперваріабельних ділянок безпосередньо і найбільш суттєво залучені у вплив на зв'язування з антигеном.

Людські антитіла за винаходом можуть бути сконструйовані шляхом об'єднання послідовностей варіабельних доменів Fv-клонів, вибраних з людських бібліотек фагового дисплея, разом з відомими послідовностями людських константних доменів, як описано вище. Альтернативно, людські моноклональні антитіла за винаходом можуть бути одержані за допомогою гібридомного методу. Також описані людські мієломні і гетеромієломні клітинні лінії людина-миша для продукування людських моноклональних антитіл, як, наприклад, у Kozbor J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); і Boerner et al., *J. Immunol.*, 147:86 (1991).

Можливе одержання трансгенних тварин (наприклад, мишей), що здатні при імунізації продукувати повний репертуар людських антитіл за відсутності продукування ендогенних імуноглобулінів. Наприклад, було описано, що гомозиготна делеція гена ділянки, що з'єднує важкий ланцюг антитіла (J_H) у химерних і в мутантних мишах зародкової лінії, приводить у результаті до повного інгібування продукування ендогенних антитіл. Перенесення зародкового порядку розташування людських імуноглобулінових генів таким мутатнтним мишам зародкової лінії приведе в результаті до продукування людських антитіл при антигенному стимулюванні. Див., наприклад, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); і Duchosal et al. *Nature*, 355:258 (1992).

Перетасування генів також може використовуватися для виділення людських антитіл з антитіл тваринного походження, наприклад з антитіл гризунів, де людське антитіло має подібні

афінності і специфічності як у вихідного антитіла тваринного походження. Відповідно до даного методу, що також називається "епітопний імпринтинг", варіабельна ділянка або важкого ланцюга, або легкого ланцюга фрагмента антитіла тваринного походження, одержана за допомогою методів фагового дисплея, як описано в даній заявці, замінюється репертуаром людських генів V-домену зі створенням популяції химер ланцюг тваринного походження/людський ланцюг scFv або Fab. Селекція з використанням антигену приводить у результаті до виділення химерних scFv або Fab у вигляді ланцюг тваринного походження/людський ланцюг, де людський ланцюг відновлює антигензв'язувальний сайт, порушений при видаленні відповідного ланцюга в первинному клоні фагового дисплея, тобто епітоп керує (відбиває) вибором партнера у вигляді людського ланцюга. При повторенні процесу з метою заміни ланцюга тваринного походження, що залишився, одержують людське антитіло (див. РСТ WO 93/06213, опубліковано 1 квітня, 1993). На відміну від традиційної гуманізації антитіл тваринного походження шляхом CDR-пересадження, даний метод забезпечує одержання повністю людських антитіл, що не мають залишків FR або CDR тваринного походження.

(v) Фрагменти антитіл

Фрагменти антитіл можуть бути генеровані за допомогою традиційних способів, таких як ферментативний гідроліз, або за допомогою рекомбінантних методів. У деяких обставинах, існують переваги використання фрагментів антитіл, а не цілих антитіл. Менший розмір фрагментів дає можливість більш швидкого виведення і може приводить до утворення твердих пухлин. Для огляду деяких фрагментів антитіл див. Hudson et al. (2003), Nat. Med. 9:129-134.

Для одержання фрагментів антитіл були розроблені різні методи. Традиційно, ці фрагменти одержували за допомогою протеолітичного розщеплення інтактних антитіл (див., наприклад, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117 (1992); і Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Однак ці фрагменти можуть бути одержані прямо рекомбінатними клітинами-хазяїнами. Фрагменти антитіла Fab, Fv і ScFv усі можуть експресуватися в E. coli і секретуватися з них, полегшуючи таким чином одержання великих кількостей цих фрагментів. Фрагменти антитіла можуть бути виділені з антитільних фагових бібліотек, які обговорювалися вище. В іншому випадку, фрагменти Fab'-SH можуть бути безпосередньо витягнуті з E. coli і хімічно зв'язані з утворенням фрагментів F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology, 10:163-167 (1992)). Відповідно до іншого підходу, F(ab')₂-фрагменти можуть бути виділені прямо з рекомбінантної клітинної культури клітин-хазяїнів. Фрагменти Fab і F(ab')₂ зі збільшеним in vivo періодом напівжиття, що містять залишки епітопа зв'язування рецептора реутилізації, описані в пат. США № 5869046. Інші способи одержання фрагментів антитіл будуть очевидні для кваліфікованого практика. У деяких втіленнях, антитіло являє собою одноланцюжковий фрагмент Fv (scFv). Див. WO 93/16185; пат. США №№ 5571894 і 5587458. Fv і scFv являють собою унікальні типи з інтактними об'єднаними сайтами, що позбавлені константних ділянок; таким чином, вони можуть бути придатними для зменшення неспецифічного зв'язування під час in vivo використання. Зшиті білки scFv можуть бути сконструйовані з одержанням зшивки ефекторного білка або на N-кінці, або на C-кінці scFv. Див. Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, вище. Фрагмент антитіла також може являти собою "лінійне антитіло", наприклад, як описано в пат. США № 5641870. Такі лінійні антитіла можуть бути моноспецифічними або біспецифічними.

(vi) Поліспецифічні антитіла

Поліспецифічні антитіла мають специфічність зв'язування щонайменше для двох різних епітопів, де епітопи звичайно з різних антигенів. У той час як такі молекули звичайно не будуть зв'язуватися з двома різними епітопами (тобто біспецифічні антитіла, BsAb), антитіла з додатковими специфічностями, такі як триспецифічні антитіла, охоплені даним виразом при його використанні в даній заявці. Біспецифічні антитіла можуть бути одержані у вигляді повнорозмірних антитіл або фрагментів антитіл (наприклад, F(ab')₂ біспецифічні антитіла).

Способи одержання біспецифічних антитіл добре відомі в даній галузі. Традиційно, одержання повнорозмірних біспецифічних антитіл ґрунтується на коекспресії двох пар імуноглобулінових важких/легких ланцюгів, де два ланцюги мають різні специфічності (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). Через випадкове перетасування важкого і легкого ланцюгів імуноглобулінів, ці гібриди (квадроми) продукують ефективну суміш з десяти різних молекул антитіл, з яких тільки одне має коректну біспецифічну структуру. Очищення коректної молекули, яке звичайно проводять за допомогою стадій афінної хроматографії, є достатньо трудомістким з низьким виходом продукту. Подібні процедури розкриті в WO 93/08829 і в Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Відповідно до іншого способу, варіабельні домени антитіла з цільовими специфічностями зв'язування (антитіло-рецептор антитіла) зшиті з послідовностями константних доменів

імуноглобулінів. Зшивання переважно здійснюється з константним доменом важкого ланцюга імуноглобуліну, що містить щонайменше частину шарніра, CH2, і CH3-ділянки. Це звичайно відбувається, якщо перша константна ділянка важкого ланцюга (CH1), що містить сайт, необхідний для зв'язування з легким ланцюгом, присутня щонайменше в одній з химер. ДНК, кодує химери важких ланцюгів імуноглобулінів, і, за необхідності, легкий ланцюг імуноглобуліну, вставляють в окремі експресуючі вектори і спільно трансформують у придатний організм-хазяїн. Це забезпечує суттєву гнучкість у регуляції взаємних пропорцій трьох поліпептидних фрагментів у тих втіленнях, коли використовували при конструюванні нерівні співвідношення трьох поліпептидних ланцюгів забезпечують оптимальний вихід. Однак можна вставити кодуєчі послідовності для двох або всіх трьох поліпептидних ланцюгів в один вектор, коли експресія щонайменше двох поліпептидних ланцюгів у рівних співвідношеннях приводить до одержання високого виходу або коли співвідношення не мають конкретного значення.

В одному втіленні даного способу, біспецифічні антитіла складаються з гібридного важкого ланцюга імуноглобуліну з першою специфічністю зв'язування на одному фрагменті і гібридної пари важкого ланцюг-легкого ланцюга імуноглобуліну (забезпечуючи другу специфічність зв'язування) на іншому фрагменті. Було виявлено, що дана асиметрична структура полегшує поділ цільової біспецифічної сполуки від небажаних комбінацій ланцюгів імуноглобулінів, оскільки присутність легкого ланцюга імуноглобуліну тільки в одній половині біспецифічної молекули забезпечує легкий спосіб поділу. Даний спосіб розкритий у WO 94/04690. Для додаткових подробиць генерації біспецифічних антитіл див., наприклад, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

Відповідно до іншого способу, описаного в WO 96/27011, область контакту між парою антитільних молекул може бути сконструйована для максимізації процентного вмісту гетеродимерів, які витягають з рекомбінантної клітинної культури. Одна область контакту містить щонайменше частину домену CH3 константного домену антитіла. У даному методі один або декілька невеликих амінокислотних бічних ланцюгів з області контакту першої антитільної молекули замінюють на більш великі бічні ланцюги (наприклад, тирозину або триптофану). Компенсаторні "порожнини" ідентичного або схожого розміру з великим бічним ланцюгом створюють в області контакту другої антитільної молекули шляхом заміни амінокислотних бічних ланцюгів на бічні ланцюги меншого розміру (наприклад, аланін або треонін). Це забезпечує механізм підвищення виходу гетеродимеру відносно інших небажаних кінцевих продуктів, таких як гомодимери.

Біспецифічні антитіла включають перехреснозшиті або "гетерокон'югати" антитіл. Наприклад, одне з антитіл у гетерокон'югаті може бути зв'язане з авідином, а інше з біотином. Такі антитіла були запропоновані, наприклад, для націлювання клітин імунної системи на небажані клітини (пат. США № 4676980) і для лікування HIV-інфекції (WO 91/00360, WO 92/200373 і EP 03089). Гетерокон'югати антитіл можуть бути одержані з використанням стандартних методів поперечного зшивання. Придатні агенти поперечного зшивання добре відомі в даній галузі й описані в пат. США № 4676980, поряд з іншими методами поперечного зшивання.

Методи утворення біспецифічних антитіл із фрагментів антитіл описані в літературі. Наприклад, біспецифічні антитіла можуть бути одержані з використанням хімічних зв'язків. Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985), описують процедуру, де інтактні антитіла протеолітично розщеплюються з утворенням фрагментів F(ab')₂. Ці фрагменти відновлюються в присутності дитіольного комплексоутворюючого агента арсеніту натрію і запобігають утворенню міжмолекулярних дисульфідних зв'язків. Утворені фрагменти Fab' потім перетворюються в похідні тіонітробензоату (TNB). Одне з похідних Fab'-TNB потім перетворюють зворотно у Fab'-тіол шляхом відновлення меркаптоетиламіну і змішують з еквімолярною кількістю іншого похідного Fab'-TNB з утворенням біспецифічного антитіла. Біспецифічні антитіла можуть використовуватися як агенти для селективної іммобілізації ферментів.

Нещодавній прогрес полегшив пряме витягання фрагментів Fab'-SH з *E. coli*, які можуть бути піддані хімічній конденсації з утворенням біспецифічних антитіл. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992), описують одержання повністю гуманізованої біспецифічної антитільної молекули F(ab')₂. Кожен фрагмент Fab' окремо секретувався з *E. coli* і піддавався спрямованій хімічній конденсації *in vitro* з утворенням біспецифічного антитіла.

Також описані різні методи одержання і виділення фрагментів біспецифічних антитіл безпосередньо з рекомбінантної клітинної культури. Наприклад, біспецифічні антитіла одержували з використанням методу лейцинової блискавки. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Пептиди з доменом лейцинової блискавки з білків Fos і Jun з'єднували з частинами Fab' двох різних антитіл за допомогою генного зшивання. Гомодимери антитіл

відновлювали в шарнірній ділянці з утворенням мономерів і потім повторно окисляли з утворенням гетеродимерів антитіл. Даний метод також застосовується для одержання гомодимерів антитіл. Технологія "діатіла", описана Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993), забезпечила альтернативний механізм одержання фрагментів біспецифічних антитіл. Фрагменти містять варіабельний домен важкого ланцюга (VH), зв'язаний з варіабельним доменом легкого ланцюга (VL) за допомогою лінкера, що занадто короткий для можливості спарювання між двома доменами на одному ланцюзі. Відповідно, домени VH і VL одного фрагмента змушені спарюватися з комплементарними доменами VL і VH іншого фрагмента, утворюючи таким чином два антигензв'язувальні сайти. Також була опублікована інша стратегія одержання фрагментів біспецифічних антитіл шляхом використання димерів одноланцюжкових Fv (sFv). Див. Gruber et al., J. Immunol, 152:5368 (1994).

Антитіла з більше ніж двома валентностями також розглядаються. Наприклад, можуть бути одержані триспецифічні антитіла. Tuft et al. J. Immunol. 147:60 (1991).

(vii) Однодоменні антитіла

У деяких втіленнях, антитіло за винаходом є однодоменним антитілом. Однодоменне антитіло являє собою єдиний поліпептидний ланцюг, що містить весь або частину варіабельного домену важкого ланцюга або весь або частину варіабельного домену легкого ланцюга антитіла. У деяких втіленнях, однодоменне антитіло являє собою людське однодоменне антитіло (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; див., наприклад, пат. США № 6248516 B1). В одному втіленні, однодоменне антитіло містить весь або частину варіабельного домену важкого ланцюга антитіла.

(viii) Варіанти антитіл

У деяких втіленнях розглядається модифікація(ї) амінокислотної послідовності антитіл, описаних у даній заявці. Наприклад, може бути доцільне поліпшення афінності зв'язування і/або інших біологічних властивостей антитіла. Варіанти амінокислотної послідовності антитіла можуть бути одержані шляхом введення відповідних замін у нуклеотидну послідовність, кодує антитіло, або за допомогою пептидного синтезу. Такі модифікації включають, наприклад, делеції і/або вставки, і/або заміни залишків усередині амінокислотних послідовностей антитіл. Будь-яка комбінація делеції, вставки і заміни може бути здійснена для досягнення кінцевого конструкта, за умови, що кінцевий конструкт буде мати цільові характеристики. Амінокислотні зміни можуть вводитися в амінокислотну послідовність антитіла об'єкта в момент одержання послідовності.

(ix) Похідні антитіл

Антитіла за винаходом можуть бути додатково модифіковані для того, щоб вони містили додаткові небілкові компоненти, які відомі в даній галузі і легкодоступні. У деяких втіленнях, компоненти, придатні для модифікації антитіла, являють собою водорозчинні полімери. Окремі приклади водорозчинних полімерів включають, зокрема, поліетиленгліколь (PEG), співполімери етиленгліколю/пропіленгліколю, карбоксиметилцелюлозу, декстран, полівініловий спирт, полівінілпіролідон, полі-1,3-діоксолан, полі-1,3,6-триоксан, співполімер етилену/малеїнового ангідриду, поліамінокислоти (або гомополімери, або випадкові співполімери), декстран або полі(н-вінілпіролідон)поліетиленгліколь, гомополімери пропіленгліколю, співполімери поліпропіленоксиду/етиленоксиду, поліоксіетиловані поліоли (наприклад, гліцерин), полівініловий спирт і їх суміші. Поліетиленглікольпропіональдегід може мати переваги в одержанні завдяки його стабільності у воді. Полімер може мати будь-яку молекулярну масу і може бути розгалуженим або нерозгалуженим. Кількість полімерів, прикріплених до антитіла, може варіюватися, і, якщо прикріплено більше ніж один полімер, то вони можуть являти собою однакові або різні молекули. Загалом, кількість і/або тип полімерів, використовуваних для модифікації, може визначатися на основі факторів, що включають, зокрема, конкретні властивості або функції поліпшуваного антитіла, чи буде похідне антитіла використовуватися в терапії за певних умов і т. д.

(x) Вектори, клітини-хазяїни і рекомбінантні методи

Антитіла також можуть бути одержані з використанням рекомбінантних методів. Для рекомбінантного продукування антитіла до антигену, виділяють нуклеїнову послідовність, кодує антитіло, і вставляють у вектор, що реплікується, для подальшого клонування (ампліфікація ДНК) або для експресії. ДНК, кодує антитіло, легко може бути виділена з використанням стандартних процедур (наприклад, шляхом використання олігонуклеотидних зондів, що здатні до специфічного зв'язування з генами, кодуючими важкий і легкий ланцюги антитіла). Доступна множина векторів. Компоненти вектора, як правило, включають, зокрема, один або декілька з наступних: сигнальну послідовність, точку початку реплікації, один або декілька генів-маркерів, енхансерний елемент, промотор і послідовність термінації транскрипції.

(a) Компонент сигнальної послідовності

Антитіло за винаходом може бути одержане рекомбінантно не тільки прямо, але також у вигляді химерного поліпептиду з гетерологічним поліпептидом, що переважно являє собою сигнальну послідовність, або інший поліпептид, що містить специфічний сайт розщеплення на N-кінці зрілого білка або поліпептиду. Вибрана гетерологічна сигнальна послідовність переважно являє собою таку, котра розпізнається і процесується (наприклад, розщеплюється за допомогою сигнальної пептидази) клітиною-хазяїном. Для прокаріотичних клітин-хазяїнів, що не розпізнають і не процесують нативну сигнальну послідовність антитіла, сигнальну послідовність заміняють на прокаріотичну сигнальну послідовність, вибрану, наприклад, із групи, що складається з лужної фосфатази, пеніцилінази, lpp або лідерів термостабільного ентеротоксину II. Для секреції в дріжджах нативна сигнальна послідовність може бути замінена, наприклад, на лідер дріжджової інвертази, лідер факторів (включаючи лідери α -фактора *Saccharomyces* і *Kluuyveromyces*) або лідер кислій фосфатази, лідер глікоамілази *C. albicans* або сигнал, описаний у WO 90/13646. При експресії в клітинах ссавців доступні для використання сигнальні послідовності ссавців, а також вірусні секреторні лідери, наприклад сигнал простого вірусу герпесу gD.

(b) Послідовність початку реплікації

Як експресуючі, так і клонуючі вектори містять послідовність нуклеїнової кислоти, яка дає вектору можливість реплікуватися в одному типі або в декількох типах вибраних клітин-хазяїнів. Як правило, у клонуючих векторах дана послідовність являє собою послідовність, яка дає можливість вектору реплікуватися незалежно від хромосомної ДНК хазяїна і включає послідовність початку реплікації або послідовності, що автономно реплікуються. Такі послідовності добре відомі для множини бактерій, дріжджів і вірусів. Послідовність початку реплікації з плазмиди pBR322 придатна для більшості грамнегативних бактерій, 2 μ , плазмідна послідовність початку реплікації придатна для дріжджів, а також різні вірусні послідовності початку реплікації (SV40, поліоми, аденовірусу, VSV або BPV) застосовуються для клонуючих векторів у клітинах ссавців. Як правило, послідовність початку реплікації не є необхідною для експресуючих векторів ссавців (як правило, послідовність початку реплікації SV40 може використовуватися тільки тому, що вона містить ранній промотор).

(c) Компонент генної селекції

Експресуючі і клонуючі вектори можуть містити ген селекції, також називаний маркером селекції. Типові гени селекції кодують білки, які (a) надають стійкість до антибіотиків або інших токсинів, наприклад до ампіциліну, неомицину, метотрексату або до тетрацикліну, (b) комплементують ауксотрофний дефіцит, або (c) підтримують критичні живильні елементи, недоступні з комплексного середовища, наприклад ген, кодуючий рацемазу D-аланіну для *Bacilli*.

Один із прикладів схеми селекції застосовує лікарський засіб для арешту росту клітини-хазяїна. Ті клітини, які успішно трансформовані гетерологічним геном, продукують білок, що надає стійкість до лікарського засобу, і, таким чином, виживають при режимі селекції. Приклади такої домінантної селекції включають неомицин, мікофенолову кислоту і гігроміцин.

Інший приклад придатних маркерів селекції для клітин ссавців являють собою такі маркери, що дають можливість ідентифікації клітин, компетентних для поглинання нуклеїнової кислоти, кодуєної антитіло, такі маркери як DHFR, глутамінсинтетаза (GS), тимідинкіназа, металотіонеїн-I і -II, переважно гени металотіонеїну приматів, аденозиндезаміназа, орнітиндекарбоксилаза і т. д.

Наприклад, клітини, трансформовані геном DHFR, ідентифікують шляхом культивування трансформантів у культуральному середовищі, яке містить метотрексат (Mtx), конкурентний антагоніст DHFR. При цих умовах ген DHFR ампліфікується поряд з будь-якою іншою котрансформованою нуклеїновою кислотою. Може використовуватися клітинна лінія яєчників китайського хом'яка (CHO), дефіцитна по ендогенній активності DHFR (наприклад, ATCC CRL-9096).

Альтернативно, клітини, трансформовані геном GS, ідентифікуються шляхом культивування трансформантів у культуральному середовищі, яке містить L-метіонінсульфоксимін (Mtx), інгібітор GS. При цих умовах ген GS ампліфікується поряд з будь-якою іншою котрансформованою нуклеїновою кислотою. Система GS-селекції/ампліфікації може використовуватися в комбінації із системою DHFR-селекції/ампліфікації, описаною вище.

Альтернативно, клітини-хазяїни (конкретно, клітини-хазяїни дикого типу, що містять ендогенний DHFR), трансформовані або котрансформовані послідовностями ДНК, кодуєними антитіло, що представляє інтерес, геном DHFR дикого типу й іншим маркером селекції, таким як аміноглікозид-3'-фосфотрансфераза (APH), можуть селектуватися з росту клітини в середовищі,

що містить агент селекції для маркера селекції, такий як аміноглікозидний антибіотик, наприклад канаміцин, неоміцин або G418. Див. пат. США № 4965199.

Придатний ген селекції для застосування в дріжджах являє собою ген *trp1*, присутній у дріжджовій плазміді YRp7 (Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979)). Ген *trp1* забезпечує маркер селекції для мутантного штаму дріжджів, позбавлених здатності рости в присутності триптофану, наприклад ATCC № 44076 або PEP4-1. Jones, Genetics, 85:12 (1977). Присутність ушкодження *trp1* у геномі дріжджової клітини-хазяїна забезпечує ефективні умови для детектування трансформації шляхом росту за відсутності триптофану. Аналогічно, *Leu2*-дефіцитні дріжджові штами (ATCC 20622 або 38626) комплементуються відомими плазмідами, що несуть ген *Leu2*.

Крім того, вектори, виділені з 1,6 μ m циклічної плазмиди pKD1, можуть використовуватися для трансформації дріжджів *Kluuyveromyces*. Альтернативно, експресуюча система для великомасштабного одержання рекомбінантного телячого хімозину була опублікована для *K. lactis*. Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990). Також розкриті стабільні мультікопійні експресуючі вектори для секреції зрілого рекомбінантного людського сироваткового альбуміну за допомогою промислових штамів *Kluuyveromyces*. Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991).

(d) Промоторний компонент

Експресуючі і клонуючі вектори, як правило, містять промотор, що розпізнається організмом-хазяїном і є функціонально зв'язаним з нуклеїновою кислотою, кодуючою антитіло. Промотори, придатні для застосування з прокаріотичними хазяїнами, включають промотор *rhoA*, промоторні системи β -лактамази і лактамази, промотор лужної фосфатази, промоторну систему триптофану (*trp*), гібридні промотори, такі як *tac*-промотор. Однак також придатні і інші відомі бактеріальні промотори. Промотори для застосування в бактеріальних системах також будуть містити послідовність Шайна-Дальгарно, функціонально зв'язану з ДНК, кодуючою антитіло.

Також відомі промоторні послідовності еукаріот. Віртуально всі еукаріотичні гени містять АТ-багату область, розташовану приблизно на 25-30 основ вище (у 5'-області) сайту ініціації транскрипції. Інша послідовність, виявлена на відстані 70-80 основ вище (у 5'-області) від старту транскрипції багатьох генів, являє собою область CNCAAT, де N може бути будь-яким нуклеотидом. На 3'-кінці більшості еукаріотичних генів присутня послідовність AATAAA, яка може бути сигналом для додавання полі-А-хвоста до 3'-кінця кодуючої послідовності. Усі ці послідовності вставлені придатним чином у еукаріотичні експресуючі вектори.

Приклади придатних промоторних послідовностей для застосування з дріжджовими хазяїнами включають промотори 3-фосфогліцераткінази або інших гліколітичних ферментів, таких як енолаза, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, гексокіназа, піруватдекарбоксилаза, фосфофруктокіназа, глюкозо-6-фосфатізомераза, 3-фосфогліцератмутаза, піруваткіназа, триозофосфатізомераза, фосфоглюкозоізомераза і глюкокіназа.

Інші дріжджові промотори, які є індукованими промоторами, що мають додаткові переваги транскрипції, контрольованої умовами росту, являють собою області промотору для алкогольдегідрогенази 2, ізоцитохрому C, кислої фосфатази, деструктивних ферментів, асоційованих з метаболізмом азоту, металотіонеїну, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази і ферментів, що відповідають за утилізацію мальтози і галактози. Придатні вектори і промотори для застосування в дріжджовій експресії додатково описані в EP 73657. Дріжджові енхансери також переважно використовуються разом із дріжджовими промоторами.

Транскрипція антитіла з векторів у клітинах-хазяїнах ссавців може контролюватися, наприклад, промоторами, одержаними з геномів вірусів, таких як вірус поліоми, вірус віспи курей, аденовірус (такий як Аденовірус 2), бичачий вірус папіломи, пташиний вірус саркоми, цитомегаловірус, ретровірус, вірус гепатиту В, Мавпячий вірус 40 (SV40), або з гетерологічних промоторів ссавців, як, наприклад, актиновий промотор або імуноглобуліновий промотор, або з промоторів білків теплового шоку, за умови, що такі промотори сумісні із системою клітин-хазяїнів.

Ранні і пізні промотори вірусу SV40 звичайно одержують у вигляді рестрикційного фрагмента SV40, який також містить послідовність початку реплікації вірусу SV40. Негайноранній промотор людського цитомегаловірусу стандартно одержують у вигляді фрагмента рестрикції HindIII E. Система для експресії ДНК у хазяїнах-ссавцях з використанням бичачого вірусу папіломи як вектора розкрита в пат. США № 4419446. Модифікація даної системи описана в пат. США № 4601978. Див. також Reyes et al., Nature, 297:598-601 (1982) про експресію кДНК людського β -інтерферону в мишачих клітинах під контролем промотору тимідинкінази з вірусу простого герпесу. Альтернативно, як промотор може використовуватися довгий кінцевий повтор вірусу саркоми Рауса.

(e) Компонент енхансерного елемента

Транскрипцію ДНК, кодуючої антитіло за даним винаходом, вищими еукаріотами часто підвищують шляхом вставки енхансерної послідовності у вектор. Відома множина енхансерних послідовностей з генів ссавців (глобін, еластаза, альбумін, α -фетопротеїн і інсулін). Як правило, фахівець буде застосовувати енхансер з вірусу еукаріотичної клітини. Приклади включають енхансер SV40, що знаходиться в пізній області від точки початку реплікації (п.н. 100-270), енхансер раннього промотору цитомегаловірусу, енхансер поліоми в пізній області від точки початку реплікації і енхансери аденовірусу. Див. також Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982) із приводу енхансерних елементів для активації еукаріотичних промоторів. Енхансер може сплайсуватися у векторі по 5'- або 3'-положенню відносно послідовності, кодуючої антитіло, але переважно він локалізований у 5'-області від промотору.

(f) Компонент термінації транскрипції

Експресуючі вектори, використовувані в еукаріотичних клітинах-хазяїнах (дріжджові, грибні, клітини комах, рослинні клітини, тваринні клітини, людські або ядровмісні клітини з інших багатоклітинних організмів) також будуть містити послідовності, необхідні для термінації транскрипції і для стабілізації мРНК. Такі послідовності звичайно доступні в 5'- і зрідка в 3'-області нетрансльованих ділянок еукаріотичної або вірусної ДНК або кДНК. Ці ділянки містять нуклеотидні сегменти, транскрибовані у вигляді поліаденільованих фрагментів у нетрансльованій області мРНК, кодуючої антитіло. Один із застосовуваних компонентів термінації транскрипції являє собою ділянку поліаденілювання бичачого гормону росту. Див. WO 94/11026 і експресуючий вектор, розкритий у даній заявці.

(g) Селекція і трансформація клітин-хазяїнів

Придатні клітини-хазяїни для клонування або експресії ДНК у векторах даної заявки являють собою прокаріотичні, дріжджові або клітини вищих еукаріот, описані вище. Придатні прокаріоти для цієї мети включають еубактерії, такі як грамнегативні або грампозитивні організми, наприклад Enterobacteriaceae, такі як Escherichia, наприклад E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, наприклад Salmonella typhimurium, Serratia, наприклад Serratia marcescans, і Shigella, а також Bacilli, такі як B. subtilis і B. licheniformis (наприклад, B. licheniformis 41P, розкриті в DD 266710, опублікованому 12 квітня 1989), Pseudomonas, такі як P. aeruginosa, і Streptomyces. Один із переважних хазяїнів для клонування серед E. coli являє собою E. coli 294 (ATCC 31446), хоча інші штами, такі як E. coli B, E. coli X1776 (ATCC 31537) і E. coli W3110 (ATCC 27325), також придатні. Ці приклади є ілюстративними, а не обмежувальними.

Повнорозмірне антитіло, білки химерних антитіл і фрагменти антитіл можуть продукуватися в бактеріях, конкретно, коли не потрібне глікозилювання і ефекторна функція Fc, як, наприклад, коли терапевтичне антитіло кон'юговане з цитотоксичним агентом (наприклад, з токсином), що сам по собі демонструє ефективність у руйнуванні пухлинних клітин. Повнорозмірні антитіла мають більш тривалий період напівжиття в кровотоці. Продукування в E. coli більш швидке і більш економічне. Для експресії фрагментів антитіл і поліпептидів у бактеріях див. пат. США № 5648237 (Carter et. al.), пат. США № 5789199 (Joly et al.), пат. США № 5840523 (Simmons et al.), у яких описана ділянка ініціації трансляції (TIR) і сигнальні послідовності для оптимізації експресії і секреції. Див. також Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254, де описана експресія фрагментів антитіл у E. coli. Після експресії антитіло може бути виділене з клітинної маси E. coli у розчинній фракції і може бути очищене за допомогою, наприклад, колонки з протеїном A або G залежно від ізотипу. Кінцеве очищення проводять аналогічно способу очищення антитіл, експресованих, наприклад, у клітинах CHO.

Додатково до прокаріотів, еукаріотичні мікроби, такі як нитковидні гриби або дріжджі, також являють собою придатних клонуючих і експресуючих хазяїнів для векторів, кодуючих антитіла. Saccharomyces cerevisiae або звичайні пекарські дріжджі є найбільш широко використовуваними серед нижчих еукаріотичних мікроорганізмів-хазяїнів. Однак ряд інших генів, видів і штамів загальнодоступні і застосовуються в даній заявці, такі як Schizosaccharomyces pombe; хазяїни Kluyveromyces, такі як, наприклад, K. lactis, K. fragilis (ATCC 12424), K. bulgaricus (ATCC 16045), K. wickerhamii (ATCC 24178), K. waltii (ATCC 56500), K. drosophilum (ATCC 36906), K. thermotolerans і K. marxianus; yarrowia (EP 402,226); Pichia pastoris (EP 183,070); Candida; Trichoderma reesia (EP 244,234); Neurospora crassa; Schwanniomycetes, такі як Schwanniomycetes occidentalis; і нитковидні гриби, такі як, наприклад, Neurospora, Penicillium, Tolypocladium, і хазяїни Aspergillus, такі як A. nidulans і A. niger. Для огляду обговорення застосування дріжджів і нитковидних грибів для продукування терапевтичних білків див., наприклад, Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004).

Можуть бути вибрані деякі гриби і дріжджові штами, у яких шляхи глікозилювання "гуманізовані", що приводить до продукування антитіла з частково або повністю людським

профілем. Див., наприклад, Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006) (де описана гуманізація шляхів глікозилування в *Pichia pastoris*); і Gerngross et al., вище.

Придатні клітини-хазяїни для експресії глікозилизованого антитіла також одержують з багатоклітинних організмів (безхребетних і хребетних). Приклади клітин безхребетних включають рослинні клітини і клітини комах. Були ідентифіковані численні бакуловірусні штами і варіанти і відповідні неов'язкові клітини-хазяїни комах, такі як *Spodoptera frugiperda* (гусениця), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодова мушка) і *Bombyx mori*. Множина вірусних штамів для трансфекції загальнодоступна, наприклад L-1-варіант *Autographa californica* NPV і Bm-5-штам *Bombyx mori* NPV, і такі віруси можуть використовуватися як вірус у даній заявці відповідно до винаходу, конкретно для трансфекції клітин *Spodoptera frugiperda*.

Культури рослинних клітин бавовни, кукурудзи, картоплі, сої, петунії, томата, ряски (*Leninaceae*), люцерни (*M. truncatula*) і тютюну також можуть застосовуватися як хазяїни. Див., наприклад, пат. США №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 і 6417429 (де описана технологія PLANTIBODIES™ для одержання антитіл у трансгенних рослинах).

Клітини хребетних можуть використовуватися як хазяїни, і розмноження клітин хребетних у культурі (тканинна культура) стало рутинною процедурою. Приклади застосовуваних ліній клітин-хазяїнів являють собою мавпячу ниркову лінію CV1, трансформовану SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); людську ембріональну ниркову лінію (клітини 293 або клітини 293, субклоновані для росту в суспензійній культурі, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клітини нирки новонародженого хом'яка (BHK, ATCC CCL 10); мишачі клітини сертолі (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); мавпячі ниркові клітини (CV1 ATCC CCL 70); клітини нирки зеленої мавпи (VERO-76, ATCC CRL-1587); людські клітини карциноми шийки матки (HELA, ATCC CCL 2); собачі ниркові клітини (MDCK, ATCC CCL 34); клітини печінки щурів buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клітини легені людини (W138, ATCC CCL 75); клітини печінки людини (Hep G2, HB 8065); клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI-клітини (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); MRC-5-клітини; FS4-клітини і клітинна лінія гепатоми людини (Hep G2). Інші застосовувані клітинні лінії клітин-хазяїнів ссавців включають клітини яєчників китайського хом'яка (CHO), включаючи клітини DHFR⁻ CHO (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); і мієломні клітинні лінії, такі як NS0 і Sp2/0. Для огляду деяких клітинних ліній ссавців, придатних для продукування антитіл, див., наприклад, Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 255-268.

Клітини-хазяїни трансфікуються вищеописаними експресуючими або клонуючими векторами для продукування антитіл і культивуються в звичайному живильному середовищі, модифікованому з відповідними змінами для індукування промоторів, селекції трансформантів або ампліфікації генів, кодуючих цільові послідовності.

(h) Культивування клітин-хазяїнів

Клітини-хазяїни, використовувані для продукування антитіла за даним винаходом, можуть культивуватися в різних середовищах. Для культивування клітин-хазяїнів придатні комерційно доступні середовища, такі як Ham F10 (Sigma), мінімальне підтримуюче середовище ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) і модифіковане Дульбекко середовище Ігла ((DMEM), Sigma). Крім того, будь-яке середовище, описане в Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), пат. США №№ 4767704; 4657866; 4927762; 4560655 або 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195 або пат. США Re. 30985, може використовуватися як культуральне середовище для клітин-хазяїнів. Будь-яке з цих середовищ може бути доповнене при необхідності гормонами і/або іншими факторами росту (такими як інсулін, трансферин або епідермальний фактор росту), солями (такими як хлорид натрію, кальцію, магнію і фосфати), буферами (такими як HEPES), нуклеотидами (такими як аденозин і тимідин), антибіотиками (такими як Гентаміцин™), мікроелементами (які можуть бути визначені як неорганічні сполуки, як правило, присутні у кінцевих концентраціях у мікромолярному діапазоні) і глюкозою або еквівалентним джерелом енергії. Будь-які інші необхідні добавки також можуть бути включені у відповідних концентраціях, відомих фахівцям у даній галузі. Культуральні умови, такі як температура, pH і т. п., є такими, як використовувалися раніше для клітин-хазяїнів, вибраних для експресії, і ці умови відомі фахівцю в даній галузі.

(xi) Очищення антитіла

При використанні рекомбінатних методів, антитіло може продукуватися внутрішньоклітинно, у периплазматичний простір або секретуватися прямо в середовище. Якщо антитіло продукується внутрішньоклітинно, то на першому етапі видаляється дисперсний дебрис або клітин-хазяїнів, або лізованих фрагментів, наприклад, шляхом центрифугування або

ультрафільтрації. Carter et al., *Bio/Technology*, 10:163-167 (1992) описують процедуру виділення антитіл, які секретуються в периплазматичний простір *E. coli*. Коротко, клітинну масу розморожують у присутності ацетату натрію (pH 3,5), EDTA і фенілметилсульфонілфториду (PMSF) протягом приблизно 30 хв. Клітинний дебрис може видалятися центрифугуванням.

5 Якщо антитіло секретується в середовище, то надосадова рідина з таких експресуючих систем, як правило, концентрується за допомогою комерційно доступного фільтра для концентрації білка, наприклад блока ультрафільтрації Amicon або Millipore Pellicon. Інгібітор протеаз, такий як PMSF, може бути включений на будь-якому з вищевказаних етапів для інгібування протеолізу, а антибіотики можуть бути включені для запобігання росту випадкових контамінантів.

10 Приготовлена з клітин композиція з антитілом може бути очищена за допомогою, наприклад, гідроксіапатитної хроматографії, хроматографії гідрофобної взаємодії, гель-електрофорезу, діалізу й афінної хроматографії, причому афінна хроматографія, як правило, є одним із переважних методів очищення. Можливість застосування протеїну А як афінного ліганду залежить від виду і ізотипу будь-якого імуноглобулінового Fc-домену, присутнього в антитілі.

15 Протеїн А може бути використаний для очищення антитіл, в основі яких лежать важкі ланцюги $\gamma 1$, $\gamma 2$ або $\gamma 4$ (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). Протеїн G рекомендується для всіх мишачих ізотипів і для людського $\gamma 3$ (Guss et al., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). Матрицею, до якої прикріплюється афінний ліганд, найчастіше є агароза, але також є інші варіанти матриць. Механічно стійкі матриці, такі як скло з контрольованим розміром пор або

20 полі(стиролдивініл)бензол, дозволяють використовувати більш високі швидкості потоку і більш короткі періоди проведення процесу в порівнянні з агарозою. У випадку, коли антитіло містить домен CH3, для очищення використовують смоли Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Також доступні інші методи очищення білків, такі як фракціонування на іонообмінній колонці, преципітація етанолом, зворотнофазова ВЕРХ, хроматографія на силікагелі,

25 хроматографія на гепариновій сефарозі™, хроматографія на аніонообмінній і катіонообмінній смолі (як, наприклад, на колонці з поліаспарагіновою кислотою), хроматофокусування, SDS-PAGE і преципітація із сульфатом амонію, залежно від антитіла, що витягається.

Загалом, у даній галузі техніки добре відомі різні методи одержання антитіл для досліджень, тестів і для клінічних застосувань, які узгоджуються з вищеописаними методами і/або

30 вважаються доцільними фахівцем у даній галузі для конкретного антитіла, що представляє інтерес.

С. Селекція біологічно активних антитіл

Антитіла, одержані, як описано вище, можуть піддаватися одному або декільком аналізам на "біологічну активність" для селекції антитіла з цільовими властивостями, виходячи з

35 терапевтичної перспективи, або для селекції складів і умов, що зберігають біологічну активність антитіла. Антитіло може тестуватися на його здатність зв'язуватися з антигеном, проти якого воно було створене. Наприклад, для антитіла до PD-L1, антигензв'язувальні властивості антитіла можуть оцінюватися в аналізі, який детектує здатність зв'язуватися з PD-L1. У деяких

40 втіленнях, зв'язування антитіла може визначатися, наприклад, за допомогою насичення зв'язування; ІФА; і/або конкурентних аналізів (наприклад, PIA). Крім того, антитіло може піддаватися іншим аналізам на біологічну активність, наприклад, з метою оцінки його ефективності як терапевтичного засобу. Такі аналізи відомі в даній галузі і залежать від антигену-мішені для призначеного застосування антитіла. Наприклад, біологічні ефекти блокади PD-L1 за допомогою антитіла можуть оцінюватися в CD8+Т-клітинах, у мишачій моделі вірусу

45 лімфатичного хоріомеїнігіту (LCMV) і/або в моделі сингенної пухлини, наприклад, як описано в патенті США № 8217149.

Для скринінгу на предмет пошуку антитіл, які зв'язуються з конкретним епітопом на антигені, що представляє інтерес (наприклад, таких, котрі блокують зв'язування антитіла до PD-L1, наприклад, з PD-L1), може здійснюватися стандартний епітоп-перехресний конкурентний аналіз,

50 такий, як описаний у *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Альтернативно, може здійснюватися епітопне картування, наприклад, як описано в *Champe et al., J. Biol. Chem.* 270:1388-1394 (1995), для визначення того, чи зв'язується антитіло з епітопом, що представляє інтерес.

Д. Приготування композицій

55 Після приготування антитіла, що представляє інтерес (наприклад, методи одержання антитіл, що були складені, як описано в даній заявці, будуть конкретно розібрані нижче і відомі в даній галузі), готують фармацевтичну композицію, яка його містить. У деяких втіленнях, антитіло для включення в композицію не піддавалося колись ліофілізації, і композиція, що представляє інтерес, являє собою водну композицію. У деяких втіленнях, антитіло являє собою повнорозмірне антитіло. В одному втіленні, антитіло в композиції являє собою фрагмент

60

антитіла, такий як $F(ab')_2$, у випадку чого вимагаються вирішення проблем, яких може не бути у випадку повнорозмірного антитіла (як наприклад укорочування антитіла до Fab). Терапевтично ефективна кількість антитіла, присутнього у композиції, визначають, беручи до уваги, наприклад, об'єми цільових доз і способ(оби) введення. Зразкова концентрація антитіла в композиції складає приблизно від 25 мг/мл приблизно до 150 мг/мл або приблизно від 30 мг/мл приблизно до 140 мг/мл, або приблизно від 35 мг/мл приблизно до 130 мг/мл, або приблизно від 40 мг/мл приблизно до 120 мг/мл, або приблизно від 50 мг/мл приблизно до 130 мг/мл, або приблизно від 50 мг/мл приблизно до 125 мг/мл, або приблизно від 50 мг/мл приблизно до 120 мг/мл, або приблизно від 50 мг/мл приблизно до 110 мг/мл, або приблизно від 50 мг/мл приблизно до 100 мг/мл, або приблизно від 50 мг/мл приблизно до 90 мг/мл, або приблизно від 50 мг/мл приблизно до 80 мг/мл, або приблизно від 54 мг/мл приблизно до 66 мг/мл.

Готують водну композицію, яка містить антитіло в рН-забуферювальному розчині. Буфер за даним винаходом має рН в інтервалі приблизно від 5 приблизно до 7. У деяких втіленнях рН знаходиться в інтервалі приблизно від 5 приблизно до 6,5, рН знаходиться в інтервалі приблизно від 5 приблизно до 6,4, в інтервалі приблизно від 5 приблизно до 6,3, рН знаходиться в інтервалі приблизно від 5 приблизно до 6,2, рН знаходиться в інтервалі приблизно від 5 приблизно до 6,1, рН знаходиться в інтервалі приблизно від 5,5 приблизно до 6,1, рН знаходиться в інтервалі приблизно від 5 приблизно до 6, рН знаходиться в інтервалі приблизно від 5,9, рН знаходиться в інтервалі приблизно від 5,8, рН знаходиться в інтервалі приблизно від 5,1 приблизно до 6, рН знаходиться в інтервалі приблизно від 5,2 приблизно до 6, рН знаходиться в інтервалі приблизно від 5,3 приблизно до 6, рН знаходиться в інтервалі приблизно від 5,4 приблизно до 6, рН знаходиться в інтервалі приблизно від 5,5 приблизно до 6, рН знаходиться в інтервалі приблизно від 5,6 приблизно до 6, рН знаходиться в інтервалі приблизно від 5,7 приблизно до 6 або рН знаходиться в інтервалі приблизно від 5,8 приблизно до 6. У деяких втіленнях винаходу композиція має рН 6 або приблизно 6. У деяких втіленнях винаходу композиція має рН 5,9 або приблизно 5,9. У деяких втіленнях винаходу композиція має рН 5,8 або приблизно 5,8. У деяких втіленнях винаходу композиція має рН 5,7 або приблизно 5,7. У деяких втіленнях винаходу композиція має рН 5,6 або приблизно 5,6. У деяких втіленнях винаходу композиція має рН 5,5 або приблизно 5,5. У деяких втіленнях винаходу композиція має рН 5,4 або приблизно 5,4. У деяких втіленнях винаходу композиція має рН 5,3 або приблизно 5,3. У деяких втіленнях винаходу композиція має рН 5,2 або приблизно 5,2. Приклади буферів, що будуть контролювати рН у даному інтервалі, включають ацетат гістидину (такого як L-гістидин) або ацетат натрію. У деяких втіленнях буфер містить ацетат гістидину або ацетат натрію в концентрації приблизно від 15 мМ приблизно до 25 мМ. У деяких втіленнях буфер містить ацетат гістидину або ацетат натрію в концентрації приблизно від 15 мМ приблизно до 25 мМ, приблизно від 16 мМ приблизно до 25 мМ, приблизно від 17 мМ приблизно до 25 мМ, приблизно від 18 мМ приблизно до 25 мМ, приблизно від 19 мМ приблизно до 25 мМ, приблизно від 20 мМ приблизно до 25 мМ, приблизно від 21 мМ приблизно до 25 мМ, приблизно від 22 мМ приблизно до 25 мМ, приблизно від 15 мМ, приблизно від 16 мМ, приблизно від 17 мМ, приблизно від 18 мМ, приблизно від 19 мМ, приблизно від 20 мМ, приблизно від 21 мМ, приблизно від 22 мМ, приблизно від 23 мМ, приблизно від 24 мМ або приблизно 25 мМ. В одному втіленні буфер містить ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 20 мМ, рН 5. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 20 мМ, рН 5,1. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 20 мМ, рН 5,2. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 20 мМ, рН 5,3. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 20 мМ, рН 5,4. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 20 мМ, рН 5,5. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 20 мМ, рН 5,6. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 20 мМ, рН 5,7. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 20 мМ, рН 5,8. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 20 мМ, рН 5,9. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 20 мМ, рН 6. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 20 мМ, рН 6,1. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 20 мМ, рН 6,2. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 20 мМ, рН 6,3. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 25 мМ, рН 5,2. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат

натрію в кількості приблизно 25 мМ, рН 5,3. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 25 мМ, рН 5,4. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 25 мМ, рН 5,5. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 25 мМ, рН 5,6. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 25 мМ, рН 5,7. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 25 мМ, рН 5,8. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 25 мМ, рН 5,9. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 25 мМ, рН 6. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 25 мМ, рН 6,1. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 25 мМ, рН 6,2. В одному втіленні, буфер являє собою ацетат гістидину або ацетат натрію в кількості приблизно 25 мМ, рН 6,3.

Композиція додатково містить сахарозу в кількості приблизно від 60 мМ приблизно до 240 мМ. У деяких втіленнях сахароза в композиції складає приблизно від 60 мМ приблизно до 230 мМ, приблизно від 60 мМ приблизно до 220 мМ, приблизно від 60 мМ приблизно до 210 мМ, приблизно від 60 мМ приблизно до 200 мМ, приблизно від 60 мМ приблизно до 190 мМ, приблизно від 60 мМ приблизно до 180 мМ, приблизно від 60 мМ приблизно до 170 мМ, приблизно від 60 мМ приблизно до 160 мМ, приблизно від 60 мМ приблизно до 150 мМ, приблизно від 60 мМ приблизно до 140 мМ, приблизно від 80 мМ приблизно до 240 мМ, приблизно від 90 мМ приблизно до 240 мМ, приблизно від 100 мМ приблизно до 240 мМ, приблизно від 110 мМ приблизно до 240 мМ, приблизно від 120 мМ приблизно до 240 мМ, приблизно від 130 мМ приблизно до 240 мМ, приблизно від 140 мМ приблизно до 240 мМ, приблизно від 150 мМ приблизно до 240 мМ, приблизно від 160 мМ приблизно до 240 мМ, приблизно від 170 мМ приблизно до 240 мМ, приблизно від 180 мМ приблизно до 240 мМ, приблизно від 190 мМ приблизно до 240 мМ, приблизно від 200 мМ приблизно до 240 мМ, приблизно від 80 мМ приблизно до 160 мМ, приблизно від 100 мМ приблизно до 140 мМ або приблизно від 110 мМ приблизно до 130 мМ. У деяких втіленнях сахароза в композиції складає приблизно 60 мМ, приблизно 70 мМ, приблизно 80 мМ, приблизно 90 мМ, приблизно 100 мМ, приблизно 110 мМ, приблизно 120 мМ, приблизно 130 мМ, приблизно 140 мМ, приблизно 150 мМ, приблизно 160 мМ, приблизно 170 мМ, приблизно 180 мМ, приблизно 190 мМ, приблизно 200 мМ, приблизно 210 мМ, приблизно 220 мМ, приблизно 230 мМ або приблизно 240 мМ.

У деяких втіленнях концентрація антитіла в композиції складає приблизно від 40 мг/мл приблизно до 125 мг/мл. У деяких втіленнях концентрація антитіла в композиції складає приблизно від 40 мг/мл приблизно до 120 мг/мл, приблизно від 40 мг/мл приблизно до 110 мг/мл, приблизно від 40 мг/мл приблизно до 100 мг/мл, приблизно від 40 мг/мл приблизно до 90 мг/мл, приблизно від 40 мг/мл приблизно до 80 мг/мл, приблизно від 40 мг/мл приблизно до 70 мг/мл, приблизно від 50 мг/мл приблизно до 120 мг/мл, приблизно від 60 мг/мл приблизно до 120 мг/мл, приблизно від 70 мг/мл приблизно до 120 мг/мл, приблизно від 80 мг/мл приблизно до 120 мг/мл, приблизно від 90 мг/мл приблизно до 120 мг/мл або приблизно від 100 мг/мл приблизно до 120 мг/мл. У деяких втіленнях, концентрація антитіла в композиції складає приблизно 60 мг/мл. У деяких втіленнях, концентрація антитіла в композиції складає приблизно 65 мг/мл. У деяких втіленнях, концентрація антитіла в композиції складає приблизно 70 мг/мл. У деяких втіленнях, концентрація антитіла в композиції складає приблизно 75 мг/мл. У деяких втіленнях, концентрація антитіла в композиції складає приблизно 80 мг/мл. У деяких втіленнях, концентрація антитіла в композиції складає приблизно 85 мг/мл. У деяких втіленнях, концентрація антитіла в композиції складає приблизно 90 мг/мл. У деяких втіленнях, концентрація антитіла в композиції складає приблизно 95 мг/мл. У деяких втіленнях, концентрація антитіла в композиції складає приблизно 100 мг/мл. У деяких втіленнях, концентрація антитіла в композиції складає приблизно 110 мг/мл. У деяких втіленнях, концентрація антитіла в композиції складає приблизно 125 мг/мл.

У деяких втіленнях поверхнево-активну речовину додають до композиції антитіл. Зразкові поверхнево-активні речовини включають неіонні поверхнево-активні речовини, такі як полісорбати (наприклад, полісорбати 20, 80 і т. д.) або поллоксамери (наприклад, поллоксамер 188 і т. д.). Кількість поверхнево-активної речовини, що додається, така, що вона зменшує агрегацію антитіла в композиції і/або мінімізує утворення частинок у композиції і/або зменшує адсорбцію. Наприклад, поверхнево-активна речовина може бути присутня у композиції в кількості приблизно від 0,001% приблизно до 0,5% (мас./об.). У деяких втіленнях, поверхнево-активна речовина (наприклад, полісорбат 20) складає приблизно від 0,005% приблизно до 0,2%, приблизно від 0,005% приблизно до 0,1%, приблизно від 0,005% приблизно до 0,09%,

приблизно від 0,005% приблизно до 0,08%, приблизно від 0,005% приблизно до 0,07%,
 приблизно від 0,005% приблизно до 0,06%, приблизно від 0,005% приблизно до 0,05%,
 приблизно від 0,005% приблизно до 0,04%, приблизно від 0,008% приблизно до 0,06%,
 приблизно від 0,01% приблизно до 0,06%, приблизно від 0,02% приблизно до 0,06%, приблизно
 5 від 0,01% приблизно до 0,05% або приблизно від 0,02% приблизно до 0,04%. У деяких
 втіленнях, поверхнево-активна речовина (наприклад, полісорбат 20) присутня у композиції в
 кількості 0,005% або приблизно 0,005%. У деяких втіленнях, поверхнево-активна речовина
 (наприклад, полісорбат 20) присутня у композиції в кількості 0,006% або приблизно 0,006%. У
 деяких втіленнях, поверхнево-активна речовина (наприклад, полісорбат 20) присутня у
 10 композиції в кількості 0,007% або приблизно 0,007%. У деяких втіленнях, поверхнево-активна
 речовина (наприклад, полісорбат 20) присутня у композиції в кількості 0,008% або приблизно
 0,008%. У деяких втіленнях, поверхнево-активна речовина (наприклад, полісорбат 20) присутня
 у композиції в кількості 0,009% або приблизно 0,009%. У деяких втіленнях, поверхнево-активна
 речовина (наприклад, полісорбат 20) присутня у композиції в кількості 0,01% або приблизно
 15 0,01%. У деяких втіленнях, поверхнево-активна речовина (наприклад, полісорбат 20) присутня у
 композиції в кількості 0,02% або приблизно 0,02%. У деяких втіленнях, поверхнево-активна
 речовина (наприклад, полісорбат 20) присутня у композиції в кількості 0,03% або приблизно
 0,03%. У деяких втіленнях, поверхнево-активна речовина (наприклад, полісорбат 20) присутня у
 композиції в кількості 0,04% або приблизно 0,04%. У деяких втіленнях, поверхнево-активна
 20 речовина (наприклад, полісорбат 20) присутня у композиції в кількості 0,05% або приблизно
 0,05%. У деяких втіленнях, поверхнево-активна речовина (наприклад, полісорбат 20) присутня у
 композиції в кількості 0,06% або приблизно 0,06%. У деяких втіленнях, поверхнево-активна
 речовина (наприклад, полісорбат 20) присутня у композиції в кількості 0,07% або приблизно
 0,07%. У деяких втіленнях, поверхнево-активна речовина (наприклад, полісорбат 20) присутня у
 25 композиції в кількості 0,08% або приблизно 0,08%. У деяких втіленнях, поверхнево-активна
 речовина (наприклад, полісорбат 20) присутня у композиції в кількості 0,1% або приблизно
 0,1%. У деяких втіленнях, поверхнево-активна речовина (наприклад, полісорбат 20) присутня у
 композиції в кількості 0,2% або приблизно 0,2%. У деяких втіленнях, поверхнево-активна
 речовина (наприклад, полісорбат 20) присутня у композиції в кількості 0,3% або приблизно
 30 0,3%. У деяких втіленнях, поверхнево-активна речовина (наприклад, полісорбат 20) присутня у
 композиції в кількості 0,4% або приблизно 0,4%. У деяких втіленнях, поверхнево-активна
 речовина (наприклад, полісорбат 20) присутня у композиції в кількості 0,5% або приблизно
 0,5%.

В одному втіленні композиція містить агенти, ідентифіковані вище (наприклад, антитіло,
 35 буфер, сахарозу і/або поверхнево-активну речовину), і по суті не містить один або декілька
 консервантів, таких як бензиловий спирт, фенол, m-крезол, хлорбутанол і бензетонію Cl. В
 іншому втіленні, консервант може бути включений у композицію, конкретно, де композиція є
 мультидозовою. Концентрація консерванту може знаходитися в інтервалі приблизно від 0,1%
 приблизно до 2%, переважно приблизно від 0,5% приблизно до 1%. Один або декілька інших
 40 фармацевтично прийнятних носіїв, допоміжних речовин або стабілізаторів, таких, як описані в
 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980), можуть бути включені в
 композицію за умови, що вони не надають побічного впливу на цільові характеристики
 композиції. Прийнятні носії, допоміжні речовини або стабілізатори є нетоксичними відносно
 реципієнтів у застосовуваних дозуваннях і концентраціях і включають додаткові буферні агенти;
 45 співрозчинники; антиоксиданти, що включають аскорбінову кислоту і метіонін; хелатуючі агенти,
 такі як EDTA; комплекси металів (наприклад, комплекси Zn-білок); біодеградовні полімери, такі
 як поліефіри; і/або солеутворюючі протиіони. Зразкові фармацевтично прийнятні носії в даній
 заявці додатково включають диспергуючі агенти інтерстиціальних лікарських засобів, такі як
 розчинні нейтрально-активні глікопротеїни гіалуронідази (sHASEGP), наприклад людські
 50 розчинні глікопротеїни PH-20 гіалуронідази, такі як rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International,
 Inc.). Деякі зразкові sHASEGP і методи їх застосування, включаючи rHuPH20, описані в
 патентних публікаціях США №№ 2005/0260186 і 2006/0104968. В одному аспекті, sHASEGP
 об'єднують з однією або з декількома додатковими глікозаміногліканазами, таким як
 хондроїтинази.

Композиція даної заявки також може містити більше ніж один білок, необхідний для
 лікування конкретного симптому, переважно білок, що має доповнюючі активності, які не
 надають шкідливого впливу на інший білок. Наприклад, у випадку, де антитіло являє собою
 антитіло до PD-L1, воно може об'єднуватися з іншим агентом (наприклад, з хіміотерапевтичним
 агентом і з протипухлинним агентом).

У деяких втіленнях, оцінюють або вимірюють фізичну стабільність, хімічну стабільність або

біологічну активність антитіла в композиції. Будь-які методи, відомі в даній галузі й описані в Прикладах даної заявки, можуть використовуватися для оцінки стабільності і біологічної активності антитіла в композиції. Наприклад, стабільність антитіла в композиції може вимірюватися, зокрема, за допомогою ексклюзійної хроматографії (SEC або ексклюзійна ВЕРХ), за допомогою капілярного ізоелектричного фокусування під контролем зображення (ICIEF), пептидного картування, за допомогою аналізу малих об'ємів методом світлотіні (HAC) і методів капілярного електрофорезу (CE), таких як аналіз CE-додецилсульфат натрію (CE-SDS) і CE-глікановий аналіз. У деяких втіленнях, антитіло в композиції стабільне при -20 °C протягом щонайменше приблизно 6 місяців, щонайменше приблизно 8 місяців, щонайменше приблизно 10 місяців, щонайменше приблизно 12 місяців, щонайменше приблизно 14 місяців, щонайменше приблизно 16 місяців, щонайменше приблизно 18 місяців, щонайменше приблизно 20 місяців, щонайменше приблизно 21 місяця, щонайменше приблизно 22 місяців, щонайменше приблизно 23 місяців, щонайменше приблизно 24 місяців, щонайменше приблизно 3 років або щонайменше приблизно 4 років. У деяких втіленнях, антитіло в композиції стабільне при 2-8 °C (наприклад, 5 °C) протягом щонайменше приблизно 6 місяців, щонайменше приблизно 8 місяців, щонайменше приблизно 10 місяців, щонайменше приблизно 12 місяців, щонайменше приблизно 14 місяців, щонайменше приблизно 16 місяців, щонайменше приблизно 18 місяців, щонайменше приблизно 20 місяців, щонайменше приблизно 21 місяця, щонайменше приблизно 22 місяців, щонайменше приблизно 23 місяців або щонайменше приблизно 24 місяців. У деяких втіленнях, стабільність антитіла в композиції після зберігання (тобто мономера антитіла) вимірюють за допомогою ексклюзійної хроматографії. У деяких втіленнях, стабільність антитіла в композиції після зберігання (тобто мономера антитіла) вимірюють за допомогою капілярного ізоелектричного фокусування під контролем зображення. У деяких втіленнях, процентний вміст мономера антитіла в композиції в порівнянні із сумарним вмістом білка (наприклад, включаючи антитіло й агрегати) складає вище ніж приблизно 60%, приблизно 65%, приблизно 70%, приблизно 75%, приблизно 80%, приблизно 85%, приблизно 86%, приблизно 87%, приблизно 88%, приблизно 89%, приблизно 90%, приблизно 91%, приблизно 92%, приблизно 93%, приблизно 94% або приблизно 95% після зберігання при -20 °C протягом щонайменше приблизно 6 місяців, щонайменше приблизно 12 місяців, щонайменше приблизно 18 місяців або щонайменше приблизно 24 місяців. У деяких втіленнях, процентний вміст мономера антитіла в композиції в порівнянні з сумарним вмістом білка (наприклад, включаючи антитіло й агрегати) складає вище ніж приблизно 60%, приблизно 65%, приблизно 70%, приблизно 75%, приблизно 80%, приблизно 85%, приблизно 86%, приблизно 87%, приблизно 88%, приблизно 89%, приблизно 90%, приблизно 91%, приблизно 92%, приблизно 93%, приблизно 94% або приблизно 95% після зберігання при 2-8 °C (наприклад, 5 °C) протягом щонайменше приблизно 6 місяців, щонайменше приблизно 12 місяців, щонайменше приблизно 18 місяців або щонайменше приблизно 24 місяців. У деяких втіленнях, процентний вміст мономера антитіла в композиції в порівнянні із сумарним вмістом білка (наприклад, включаючи антитіло й агрегати) складає вище ніж приблизно 60%, приблизно 65%, приблизно 70%, приблизно 75%, приблизно 80%, приблизно 85%, приблизно 86%, приблизно 87%, приблизно 88%, приблизно 89%, приблизно 90%, приблизно 91%, приблизно 92%, приблизно 93%, приблизно 94% або приблизно 95% після зовування при кімнатній температурі (наприклад, приблизно від 15 °C до 25 °C) протягом щонайменше приблизно 2 годин, щонайменше приблизно 4 годин, щонайменше приблизно 6 годин, щонайменше приблизно 8 годин, щонайменше приблизно 10 годин, щонайменше приблизно 12 годин, щонайменше приблизно 14 годин, щонайменше приблизно 16 годин, щонайменше приблизно 18 годин, щонайменше приблизно 20 годин або щонайменше приблизно 24 годин. У деяких втіленнях, процентний вміст всіх агрегатів (наприклад, високомолекулярних частинок і низькомолекулярних частинок) у композиції складає менше ніж приблизно 0,1%, приблизно 0,2%, приблизно 0,3%, приблизно 0,4%, приблизно 0,5%, приблизно 0,6%, приблизно 0,7%, приблизно 0,8%, приблизно 0,9%, приблизно 1%, приблизно 2%, приблизно 3%, приблизно 4%, приблизно 5%, приблизно 6%, приблизно 7%, приблизно 8%, приблизно 9% або приблизно 10% після зберігання при -20 °C протягом щонайменше приблизно 6 місяців, щонайменше приблизно 12 місяців, щонайменше приблизно 18 місяців або щонайменше приблизно 24 місяців. У деяких втіленнях, процентний вміст всіх агрегатів (наприклад, високомолекулярних частинок і низькомолекулярних частинок) у композиції складає менше ніж приблизно 0,1%, приблизно 0,2%, приблизно 0,3%, приблизно 0,4%, приблизно 0,5%, приблизно 0,6%, приблизно 0,7%, приблизно 0,8%, приблизно 0,9%, приблизно 1%, приблизно 2%, приблизно 3%, приблизно 4%, приблизно 5%, приблизно 6%, приблизно 7%, приблизно 8%, приблизно 9% або приблизно 10% після зберігання при 2-8 °C (наприклад, 5 °C) протягом

щонайменше приблизно 6 місяців, щонайменше приблизно 12 місяців, щонайменше приблизно 18 місяців або щонайменше приблизно 24 місяців. У деяких втіленнях, процентний вміст всіх агрегатів (наприклад, високомолекулярних частинок і низькомолекулярних частинок) у композиції складає менше ніж приблизно 0,1%, приблизно 0,2%, приблизно 0,3%, приблизно 0,4%, приблизно 0,5%, приблизно 0,6%, приблизно 0,7%, приблизно 0,8%, приблизно 0,9%, приблизно 1%, приблизно 2%, приблизно 3%, приблизно 4%, приблизно 5%, приблизно 6%, приблизно 7%, приблизно 8%, приблизно 9% або приблизно 10% після збовтування при кімнатній температурі (наприклад, приблизно 15-25 °C) протягом щонайменше приблизно 2 годин, щонайменше приблизно 4 годин, щонайменше приблизно 6 годин, щонайменше приблизно 8 годин, щонайменше приблизно 10 годин, щонайменше приблизно 12 годин, щонайменше приблизно 14 годин, щонайменше приблизно 16 годин, щонайменше приблизно 18 годин, щонайменше приблизно 20 годин або щонайменше приблизно 24 годин. У будь-якому з втілень даної заявки стабільна композиція може зберігатися в скляному флаконі, у контейнері з металевого сплаву або в пакеті для внутрішньовенного введення (IV). У деяких втіленнях, металевий сплав являє собою нержавіючу сталь 316L або сплав "Хастеллой".

Композиції, використовувані для введення *in vivo*, повинні бути стерильними. Цього легко досягти фільтрацією через стерильну фільтраційну мембрану до або після приготування композиції.

III. Способи лікування і введення композицій антитіл

Композицію вводять ссавцю, що потребує лікування за допомогою антитіла, переважно людині, відповідно до відомих методів, таких як внутрішньовенне введення (наприклад, у вигляді болюсу або за допомогою безперервної інфузії протягом деякого періоду часу), за допомогою внутрішньом'язового, внутрішньоочеревинного, внутрішньоспинномозкового, внутрішньосуглобового, внутрішньосиновіального, внутрішньооболонкового, перорального, місцевого або інгаляційного шляхів введення. В одному втіленні, композицію вводять ссавцю за допомогою внутрішньовенного введення. Для таких цілей, композицію можуть ін'єктувати з використанням шприца або, наприклад, за допомогою IV-катетера. В одному втіленні, композицію вводять ссавцю за допомогою підшкірного введення.

Відповідне дозування ("терапевтично ефективна кількість") антитіла буде залежати, наприклад, від типу і тяжкості стану, що піддається лікуванню, від того, чи вводиться антитіло для превентивних або терапевтичних цілей, попередньої терапії, історії хвороби пацієнта і відповіді на антитіло, типу використовуваного антитіла і залежно від думки лікуючого лікаря. Антитіло вводять придатним чином пацієнту однократно або багаторазово, а також антитіло може вводиться пацієнту в будь-який час після постановки діагнозу. Антитіло може вводиться у вигляді єдиної терапії або разом з іншими лікарськими засобами або терапіями, застосовуваними для лікування розглянутого патологічного стану.

Як загальне припущення, терапевтично ефективна кількість антитіла, що вводиться людині, буде знаходитися в інтервалі приблизно від 0,01 приблизно до 50 мг/кг маси пацієнта, або за допомогою однократного введення, або за допомогою багаторазових введень. У деяких втіленнях, антитіло вводять у добовій дозі, що складає, наприклад, приблизно від 0,01 приблизно до 45 мг/кг, приблизно від 0,01 приблизно до 40 мг/кг, приблизно від 0,01 приблизно до 35 мг/кг, приблизно від 0,01 приблизно до 30 мг/кг, приблизно від 0,01 приблизно до 25 мг/кг, приблизно від 0,01 приблизно до 20 мг/кг, приблизно від 0,01 приблизно до 15 мг/кг, приблизно від 0,01 приблизно до 10 мг/кг, приблизно від 0,01 приблизно до 5 мг/кг або приблизно від 0,01 приблизно до 1 мг/кг. У деяких втіленнях, антитіло вводять у кількості 15 мг/кг. Однак можуть бути застосовні інші режими дозування. В одному втіленні антитіло до PD-L1, описане в даній заявці, вводять людині в дозі, що складає приблизно 100 мг, приблизно 200 мг, приблизно 300 мг, приблизно 400 мг, приблизно 500 мг, приблизно 600 мг, приблизно 700 мг, приблизно 800 мг, приблизно 900 мг, приблизно 1000 мг, приблизно 1100 мг, приблизно 1200 мг, приблизно 1300 мг або приблизно 1400 мг, у перший день 21-денного курсу. Доза може вводиться у вигляді однократної дози або багаторазово (наприклад, 2 або 3 дози), як, наприклад, інфузією. Доза антитіла, що вводиться, у комбінованій терапії може зменшуватися в порівнянні з єдиною терапією. Прогрес даної терапії легко відстежити за допомогою стандартних методів.

Композиції, які містять антитіло до PD-L1, описане в даній заявці, можуть використовуватися в різноманітних *in vitro* і *in vivo* діагностиках і в терапевтичних застосуваннях. Наприклад, композиція, що містить антитіло, може вводиться об'єкту або індивідууму для лікування захворювання або розладу (наприклад, захворювання або розладу, опосередкованого взаємодією PD-1 і PD-L1).

У деяких втіленнях, захворювання або розлад являє собою злоякісне новоутворення. У деяких втіленнях, злоякісне новоутворення являє собою локальний прояв або метастатичний. У

деяких втіленнях, злоякісне новоутворення вибране із групи, що складається з твердої пухлини, гематологічного злоякісного новоутворення, раку сечового міхура, злоякісного новоутворення мозку, раку молочної залози, раку прямої кишки, колоректального раку, шлунково-кишкового раку, гліоми, раку голови, лейкозу, раку печінки, раку легені (наприклад, недрібноклітинного раку легені), лімфоми, мієломи, раку шиї, раку яєчників, меланоми, раку підшлункової залози, раку нирок, раку слинної залози, раку шлунка, раку тимуса, епітеліального раку, раку щитовидної залози і плоскоклітинної карциноми голови і шиї. У деяких втіленнях, об'єкт або індивідуум, що піддається лікуванню, має PD-L1-позитивні злоякісні клітини (наприклад, детектовані за допомогою ІГХ).

У деяких втіленнях, захворювання або розлад являє собою інфекцію. У деяких втіленнях, інфекція являє собою хронічну інфекцію. У деяких втіленнях, інфекція являє собою вірусну інфекцію, бактеріальну інфекцію, грибову інфекцію, інфекцію гельмінтами або інфекцію найпростішими. У деяких втіленнях, вірусна інфекція вибрана з групи, що складається з інфекції цитомегаловірусом Епштейна-Барра, вірусом гепатиту В, гепатиту С, вірусом герпесу, вірусом кору, вірусом грипу, вірусом імунодефіциту людини, людським Т-лімфотропним вірусом, вірусом лімфоцитарного хориомеїніту, респіраторно-синцитіальним вірусом і/або риновірусом. У деяких втіленнях, бактеріальна інфекція вибрана з групи, що складається з *Helicobacter* spp., *Mycobacterium* spp., *Porphyrromonas* spp., *Chlamydia* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *Klebsiella* spp., *Borrelia* spp., *Bacterioides* spp. і *Treponema* spp. У деяких втіленнях, протозойна інфекція вибрана з групи, що складається з *Leishmania* spp., *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma* spp., *Toxoplasma* spp., *Trypanosoma* spp. і *Taenia* spp. У деяких втіленнях, грибкова інфекція вибрана з групи, що складається з бластомікозу, кокцидіоїдозу, гістоплазмозу, кандидозу, криптококозу, аспергильозу, мукомікозу і пневмоцистозу.

У деяких втіленнях, захворювання або розлад являє собою запальне захворювання. У деяких втіленнях, запальне захворювання вибране з групи, що складається з наступних: гострий розсіяний енцефаломієліт, хвороба Аддісона, хвороба Альцгеймера, хвороба Бехтерева, синдром антифосфоліпідних антитіл, атеросклероз, аутоімунна гемолітична анемія, аутоімунний гепатит, артрит, хвороба Бехчета, хвороба Бергера, бульозний пемфігоїд, целиакія, хвороба Чагаса, холангіт, хвороба Крона, дерматоміозит, цукровий діабет типу 1, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, трансплантат проти хазяїна, хвороба Грейвса, синдром Гійєна-Барре, хвороба Хашимото, кропивниця, гіперсиндром IgE, ідіопатична тромбоцитопенічна пурпура, системний червоний вовчак, вовчаковий нефрит, розсіяний склероз, міастенія Gravis, відторгнення трансплантації органів, хвороба Паркінсона, пухирчатка, перніціозна анемія, поліміозит, первинний біліарний цироз печінки, псоріаз, синдром Рейно, ревматоїдний артрит, склеродермія, синдром Шегрена, скроневий артеріт, тиреоїдит, неспецифічний виразковий коліт, увеїт, васкуліт і гранулематоз Вегенера.

У деяких втіленнях, композиція, яка містить антитіло, може вводитися об'єкту або індивідууму разом з іншим терапевтичним агентом для лікування захворювання або розладу. Наприклад, для лікування злоякісного новоутворення композиція з антитілом до PD-L1, описана в даній заявці, може вводитися разом з іншою протипухлинною терапією (наприклад, з хіміотерапією або з іншою терапією антитілами).

IV. Готові вироби або набори

В іншому втіленні винаходу, пропонується готовий виріб або набір, який містить контейнер, що включає в себе водну фармацевтичну композицію за винаходом, і необов'язково пропонуються інструкції з її застосування. Придатні контейнери включають, наприклад, флакони, ампули, пакети і шприци. Контейнер може бути з різних матеріалів, таких як скло, пластик (такий як полівінілхлорид або поліолефін) або металевий сплав (такий як нержавіюча сталь або "Хастеллой"). Типовий контейнер являє собою 300-мл контейнер з металевого сплаву (наприклад, для зберігання при -20 °C). Інший типовий контейнер може являти собою 10-50-мл скляний флакон (наприклад, для зберігання при 2-8 °C). Наприклад, контейнер може являти собою скляний флакон об'ємом 10 мл, 15 мл, 20 мл або 50 мл. Контейнер містить композицію і має маркування або разом з контейнером ідуть інструкції з застосування. Виріб може додатково включати інші матеріали, бажані з комерційної і користувацької точки зору, включаючи інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки, шприци і листок-вкладиш з інструкцією з застосування. У деяких втіленнях, готовий виріб додатково включає один або декілька інших агентів (наприклад, хіміотерапевтичний агент, протипухлинний агент). Придатні контейнери для одного або декількох агентів включають, наприклад, флакони, ампули, пакети і шприци.

Передбачається, що опису достатньо для того, щоб фахівець зміг практично здійснити винахід. Фахівцю в даній галузі на основі вищеописаного очевидні різні модифікації винаходу

додатково до тих, що були представлені, і вони входять у рамки прикладеної формули винаходу. Усі публікації, патенти і патентні заявки, процитовані в даній заявці, включені посиланням у всій повноті і для всіх цілей.

ПРИКЛАДИ

5 Винахід буде більш зрозумілий при посиланні на наступні приклади. Однак їх не слід розглядати як обмеження рамок винаходу. Зрозуміло, що приклади і варіанти, описані в даній заявці, надані в ілюстративних цілях і різні модифікації або зміни будуть запропоновані фахівцями в даній галузі з їх урахуванням і повинні бути включені відповідно до рамок і галузі застосування даної заявки й обсягу домагань прикладеної формули винаходу.

10 Приклад 1. Розробка композиції антитіла до PD-L1

Антитіло до PD-L1 (α -PD-L1) являє собою аглікозизоване антитіло IgG1, виділене з CHO, призначене для відновлення Т-клітинної функції через інгібування взаємодій PD-L1/PD-1. Проблему на початковому етапі розробки склало потенційне окислювання і глікування Trp поблизу від ділянок CDR і деяке окислювання метіоніну. Попередні випробування надійності виявили, що оптимальним є більш високе рН, ніж відзначалося раніше (рН 5,5). Цільова доза являла собою фіксовану дозу, але при цьому також розглядалася доза на основі маси. Аналітичні дослідження проводили для аналізу стабільності різних композицій, і в результаті була вибрана композиція (60 мг/мл α -PD-L1, 20 мМ His AcO, рН 5,8, 120 мМ сахароза, 0,04% PS20). Початкові дослідження композиції підтримують до трьох років стабільності лікарської речовини (DS) і лікарського продукту (DS).

Матеріали і Методи

Одержання композицій α -PD-L1

Матеріал α -PD-L1, що піддавався ультрафільтрації/діалізації, піддавали дослідженням по розробці композиції. Матеріал діалізували в різних буферах з використанням діалізних касет 10000 Дальтон. Після діалізу концентрацію білка доводили до досягнення цільової концентрації і вносили стоковий розчин 10% PS20 для досягнення цільової концентрації PS20. Композиційний матеріал асептично додавали в 2-мл скляні флакони Forma Vitrum, заповнюючи об'єм на 1 мл, і герметично закривали за допомогою 13 мм пробки Daikyo 777-1. Зразки зберігали у вертикальному положенні або при 5 °C, 25 °C, або при 40 °C.

30 Колір, зовнішній вигляд і прозорість (CAC)

Колір зразка, зовнішній вигляд і прозорість визначали візуально за допомогою візуального огляду при білому флуоресцентному світлі з чорно-білим фоном при кімнатній температурі, як описано в методах Європейської Фармакопеї (ЄФ) (Council of Europe. European Pharmacopoeia, 2008, 7th Ed., EP 2.2.2 and EP 2.2.1). 3-мл флакон заповнювали за допомогою 1мл кожного тестованого зразка. Негативний контроль (очищена вода) з відповідним об'ємом зразка використовували для порівняння.

Вимірювання концентрації білка

Концентрацію білка визначали шляхом вимірювання УФ-поглинання на спектрофотометрі Agilent 8453 (Санта-Клара, Каліфорнія) за допомогою волюметричного розведення зразка приблизно до 0,5 мг/мл з використанням 0,9% сольового розчину. За 0 приймали 0,9% сольовий розчин, і поглинання вимірювали при A_{\max} приблизно 280 нм, а також при 320 нм. Відмінність між A_{\max} і A_{320} розраховували з одержанням скоректованого значення A_{\max} , використовуюваного для визначення кінцевої концентрації білка з коефіцієнтом поглинання $1,5 \text{ мл} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$.

Вимірювання каламутності

45 Середню оптичну густину зразків при 350 нм вимірювали в кварцовій кюветі з товщиною шару 1 см на спектрофотометрі Agilent 8453. Очищену воду використовували як порожній контроль.

Метод світлотіні для невидимих частинок (аналіз HIAC)

Підрахунок частинок у зразках здійснювали з використанням світлотіні, вимірюваної за допомогою HIAC-Royco моделі 9703 (HACH, Лавленд, Колорадо). Середню сукупну кількість частинок на мілілітр $\geq 2 \text{ мкм}$, $\geq 5 \text{ мкм}$, $\geq 10 \text{ мкм}$ і $\geq 25 \text{ мкм}$ заносили в таблицю для кожного зразка з використанням програми PharmSpec v2.0. На один тест здійснювали чотири зчитування, припускаючи сумарний об'єм 1,6 мл кожного зразка, перше зчитування не враховували, а 3 зчитування, що залишилися, усереднювали.

55 Ексклюзійна хроматографія (SEC або ексклюзійна ВЕРХ)

Розподіл варіантів за розміром визначали за допомогою ексклюзійної хроматографії (SEC) з використанням колонки TosoHaas Bioscience G3000 SWXL (Південний Сан-Франциско, Каліфорнія) при 30 °C на Agilent 1200 ВЕРХ (Санта-Клара, Каліфорнія, США). Усі зразки ін'єктували нерозведеними в кількості 50 мкг на колонку і елюювали протягом 60 хвилин з УФ-поглинанням при 280 нм. Два різні методи SEC використовували для тестування зразків. У

методі 1 використовували 0,2М фосфат калію, 0,25М хлорид калію, pH 6,2, у той час як у методі 2 використовували 0,2М фосфат калію, 0,25М хлорид калію, pH 6,2, з 10% (об./об.) ізопропанолом як рухомою фазою. Результати представлені у вигляді відносного відсотка площі піка від сумарної площі під кривою.

5 Капілярне ізоелектричне фокусування під контролем зображення (ICIEF)

Розподіл заряджених варіантів оцінювали за допомогою iCIEF з використанням аналізатора iCE280 (ProteinSimple) із фторвуглецевим покриттям капілярного картриджа (100 мкм × 5 см). Розчин амфоліту складався із суміші 0,35% метилцелюлози (MC), 0,75% Pharmalyte 3-10 амфоліт-носіїв, 4,2% Pharmalyte 8-10,5 амфоліт-носіїв і 0,2% pI-маркер 7,40 і 0,15% pI-маркер 9,77 в очищеній воді. Аноліт являв собою 80 мМ фосфорну кислоту, а католіт являв собою 100 мМ гідроксид натрію, обидва в 0,1% метилцелюлозі. Зразки розводили в очищеній воді і додавали CrV до кожного розведеного розчину у співвідношенні ферменту до субстрату 1:100 з наступним інкубуванням при 37 °C протягом 20 хвилин. Зразки, оброблені CrV, змішували з розчином амфоліту і потім фокусували шляхом введення напруги 1500 В протягом однієї хвилини з наступною напругою 3000 В протягом 10 хвилин. Зображення фокусованих заряджених варіантів α -PD-L1 одержували шляхом пропускання ультрафіолетового випромінювання 280 нм через капіляр і в об'єктив цифрової камери з пристроєм із зарядовим зв'язком. Зображення потім аналізували для визначення розподілу різних заряджених варіантів.

Пептидне картування

Метод пептидного картування використовували для відстеження окислювання триптофану (W) і метіоніну (M). Для одержання пептидних карт α -PD-L1, білок гідролізували за допомогою трипсину після експонування білка з дитіотреїтолом (DTT) і йодоцтовою кислотою (IAA) у процесі, що відновлює дисульфідні зв'язки і змінює кінцеві вільні тіоли з одержанням карбоксиметильних похідних. Одержані в результаті пептиди розділяли з використанням високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою (ОФ-ВЕРХ) і відслідковували при 214 нм. Маси триптичних пептидів визначали за допомогою PX-MC-аналізу розділеної гідролізованої суміші з використанням мас-спектрометра ThermoFisher Scientific LTQ-Orbitrap.

Результати

Вибір буферної системи

У процесі розробки композиції оцінювали дві буферні системи. Одна являла собою 20 мМ ацетат гістидину, що містить 240 мМ сахарози, з pH 5,5, а інша являла собою 200 мМ сукцинат аргініну, з pH 5,5. Прискорене дослідження стабільності виявило, що α -PD-L1 мав кращу стабільність у буфері ацетату гістидину в порівнянні з буфером сукцинату аргініну (Таблиця 1). Таким чином, ацетат гістидину був вибраний для подальшої розробки композицій.

Таблиця 1

Нульовий порядок швидкості деградації α -PD-L1 для ICIEF і головного піка ексклюзійної ВЕРХ в буфері ацетату гістидину і в буфері сукцинату аргініну при 30 °C

Буфери	Швидкість % зменшення головного піка за місяць при 30 °C	
	ICIEF	ЕКСКЛЮЗІЙНА ВЕРХ
Ацетат гістидину*	5,7	1
Сукцинат аргініну**	17,6	1,5

Примітка: всі композиції зберігали до 1 місяця при 30 °C; аналіз здійснювали з використанням ICIEF і ексклюзійної ВЕРХ;

*150 мг/мл α -PD-L1 в 20 мМ ацетаті L-гістидину, 240 мМ сахарози і 0,02% (мас./об.) полісорбату 20 при pH 5,5;

**150 мг/мл α -PD-L1 в 200 мМ сукцинату аргініну, 0,02% (мас./об.) полісорбату 20 при pH 5,5.

Вибір стабілізатора

Сахарозу (120 мМ) вибирали як стабілізатор для рідкої композиції α -PD-L1 на основі її здатності захищати білок від агрегації, індукованої заморожуванням/розморожуванням, а також на основі її функції як кріопротектора протягом тривалого зберігання в замороженому стані лікарської речовини (DS) і зберігання лікарського продукту (DP) при 2-8 °C.

У процесі розробки композиції, α -PD-L1, при 50 мг/мл у 20 мМ ацетаті L-гістидину, pH 5,5, 0,02% (мас./об.) полісорбату 20, і різні концентрації сахарози в інтервалі від 0 мМ до 120 мМ піддавали п'ятьом циклам заморожування/розморожування. Якість продукту вимірювали за допомогою аналізу ексклюзійної ВЕРХ, який виявив, що 60 мМ сахарози достатньо для

запобігання підвищенню ВМЧ (високомолекулярних частинок) α -PD-L1 (Таблиця 2).

- Крім того, було показано, що 120 мМ сахароза підтримує стабільність лікарської речовини при зберіганні в замороженому вигляді при -20 °С протягом щонайменше 6 місяців (Таблиця 3). Таким чином, на основі результатів дослідження заморожування/розморожування, а також досліджень тривалої стабільності лікарської речовини, яку зберігали при -20 °С, для рідкої композиції α -PD-L1 була вибрана сахароза в концентрації 120 мМ.

Таблиця 2

Ефект концентрації сахарози відносно стабільності α -PD-L1 за допомогою ексклюзивної ВЕРХ, процент високомолекулярних частинок під час заморожування і розморожування

Сахароза конц. (мМ)	З/Р-цикли	ЕКСКЛЮЗИЙНА ВЕРХ		CAC	pH
		% ВМВ	% мономера		
T0	Не доступно	1,2	98,8	SY, CL, PFVP	5,6
0 мМ	5	1,4	98,6	SY, CL, PFVP	5,7
60 мМ	5	1,2	98,8	SY, CL, PFVP	5,7
120 мМ	5	1,2	98,8	SY, CL, PFVP	5,6

Примітка: всі композиції містять 50 мг/мл α -PD-L1, 20 мМ ацетату L-гістидину, 0,02% (мас./об.) полісорбату 20, pH 5,5; аналіз здійснювали з використанням ексклюзивної ВЕРХ; З/Р = заморожування/розморожування; ВМЧ = високомолекулярні частинки; SY = жовтуватий; CL = прозорий; PFVP = особливо вільний від видимих частинок.

Таблиця 3

Дані по довгостроковій стабільності для розробленої партії лікарської речовини α -PD-L1

						Q12631 ICIEF			Q12589 SEC		Q12695 CE-SDS-NGS (невідновлений)			Q12708 Ефек- тивність
Темп. (°C)	Час (дні/мі- сяці)	Q12005 CAC	Q1200 3 pH	Q12398 дозу- вання (мг/мл)	Кислот- на ді- лянка (площа %)	Голов- ний пік (площа %)	Основ- на ді- лянка (площа %)	Сукуп- ність форм ВМЧ (площа %)	Пік моно- мера (площа %)	Сукуп- ність форм НМЧ (площа %)	Сукуп- ність препеків (% CPA)	Голов- ний пік (% CPA)	Сукуп- ність пост- пеків (% CPA)	(% від- носної ефек- тивнос- ті)
NA	T = 0/0	SY, CL, PFVP	5,9	60,1	17,3	79,7	3	0,7	99,2	0,1	2,7	97	0,3	107
-20 °C	30/1	SY, CL, PFVP	5,9	62,9	16,9	80,2	2,9	0,6	99,3	0,1	2,8	97	0,2	109
-20 °C	61/2	SY, CL, PFVP	5,9	61,4	16,5	80,8	2,7	0,6	99,4	0,1	2,5	97,3	0,3	NT
-20 °C	91/3	SY, CL, PFVP	5,9	62,5	18,1	79	3	0,6	99,3	0,1	2,8	97,1	0,2	96
-20 °C	183/6	SY, CL, PFVP	5,9	61,1	17,9	79	3,1	0,6	99,4	0,1	3,1	96,6	0,3	100
5 °C	30/1	SY, CL, PFVP	5,9	61,1	18,1	79	2,9	0,7	99,2	0,1	2,6	97	0,4	101
5 °C	61/2	SY, CL, PFVP	5,9	62,3	17,4	79,8	2,8	0,8	99,2	0,1	2,9	96,7	0,4	NT
5 °C	91/3	SY, CL, PFVP	5,9	63,9	17,4	80,1	2,5	0,9	99	0,1	3	96,5	0,5	107
5 °C	183/6	SY, CL, PFVP	5,9	59,5	19,7	77,4	3	1,1	98,8	0,1	3,3	95,9	0,8	102

Примітка: всі композиції містять 60 мг/мл α -PD-L1 в 20 мМ ацетату L-гістидину, 120 мМ сахарози, 0,04% PS20, pH 5,8. 25-мл 316L невеликі банки з нержавіючої сталі використовували для даного дослідження; NA = недоступно; CAC = колір, зовнішній вигляд і прозорість; SY = жовтуватий, CL = прозорий, PFVP = практично вільний від видимих частинок; ВМЧ = високомолекулярні частинки; НМЧ = низькомолекулярні частинки; ICIEF = капілярне ізоелектричне фокусування під контролем зображення; CE-SDS = капілярний електрофорез з додецилсульфатом натрію; NT = не тестували; TBD = буде визначено.

Попередні дослідження стійкості композиції: вибір концентрації білка, pH і концентрації полісорбату 20

План дробового факторного експерименту (DOE) використовували для додаткового дослідження ефектів параметрів композиції α -PD-L1 відносно стабільності білка. Тестували сумарно дванадцять різних композицій α -PD-L1 (десять експериментів і дві центральні точки). Три фактори, які варіювалися в дослідженні, це pH в інтервалі 5-6 з інтервалом 0,5 одиниць, концентрація білка в інтервалі 40-120 мг/мл і концентрація полісорбату 20 в інтервалі 0,005-0,06% (мас./об.) (Таблиця 4). Усі композиції були забуферені за допомогою 20 мМ ацетату гістидину, що містить 120 мМ сахарозу, за винятком останніх двох композицій, як зазначено в Таблиці 4. Композицію з 25 мМ ацетату гістидину оцінювали, оскільки передбачалося, що вона буде являти собою гірший випадок у розумінні ризику окислювання. Буфер 20 мМ ацетату натрію оцінювали у вигляді резервної буферної системи і порівнювали з буфером ацетату гістидину. Композиції зберігали при 25 °C протягом 2 місяців і при 40 °C протягом 1 місяця. Дані по стабільності з вищеописаних досліджень статистично аналізували на предмет взаємодій між параметрами композиції з використанням програми JMP (JMP, Версія 9, SAS Institute Inc., Кері, Північна Кароліна).

Таблиця 4

Лікарську речовину α -PD-L1 і композиції лікарського продукту оцінювали в дослідженні DOE

Композиція	Антитіло до PD-L1 (мг/мл)	Розчин pH	PS20 (% мас./об.)	His-ацетат (мМ)	Сахароза (мМ)
F1 ^a	50	5,5	0,04	20	120
F2 ^a	100	5,5	0,04	20	120
F3	40	6	0,06	20	120
F4	120	5	0,06	20	120
F5	120	6	0,005	20	120
F6	40	5	0,06	20	120
F7	120	5	0,005	20	120
F8	40	6	0,005	20	120
F9	40	5	0,005	20	120
F10	120	6	0,06	20	120
F11 ^b	50	5,5	0,06	25	120
F12 ^c	50	5,5	0,04	20 (Na-Ace)	120

Примітка: ^aцентральні точки; ^bгірший випадок: низька концентрація білка, висока концентрація PS20, висока концентрація гістидину; ^cтестували буфер 20 мМ ацетату натрію (Na-Ace).

У порівнянні з pH 5 і 5,5, композиція при pH 6 мала трохи більш повільну швидкість втрати головного піка, що визначали за допомогою ICIEF при 40 °C і 25 °C (Фіг. 1A-B і Фіг. 2A-B, відповідно). Ніякого значного впливу концентрації на втрату головного піка не спостерігали за допомогою ICIEF. Аналіз композиції F1 продемонстрував, що збільшення кількості кислого варіанта сприяло, насамперед, втраті головного піка в ICIEF, у той час як внесок у втрату піка основного зарядженого варіанта був незначним. При таких же умовах зберігання композиція при pH 6 також мала більш повільну швидкість втрати піка мономера, що вимірювали за допомогою ексклюзійної ВЕРХ при 40 °C і при 25 °C (Фіг. 3A-B і Фіг. 4A-B, відповідно). Аналіз композиції F1 продемонстрував, що як утворення ВМЧ, так і НМЧ сприяло втраті мономера в SEC при підвищених температурах (тобто, 40 °C і 25 °C). Обидва профілі змін pH, одержані за допомогою SEC і ICIEF, знайшли, що pH 5,5-6 є оптимальним інтервалом pH для α -PD-L1. Щоб потрапити усередину діапазону умов стабільності білка при pH вище 5,5 і дозволити коливання $\pm 0,3$ одиниці pH у композиції активної речовини і лікарського продукту, було вибране значення pH 5,8.

Вищеописані дослідження композицій також знайшли, що композиції, які містять 120 мг/мл α -PD-L1, при pH в інтервалі 5-6, мали трохи більш високу, але не значно, швидкість втрати піка мономера завдяки більш високій швидкості утворення ВМЧ у порівнянні з композиціями 40 мг/мл при такому ж pH, що визначали за допомогою ексклюзійної ВЕРХ (Фіг. 3A-B і Фіг. 4A-B). На основі цих даних і для підтримання композиції з поліпшеною стабільністю продукту і для полегшення дозування для пацієнта вибрали концентрацію α -PD-L1, що складає 60 мг/мл.

Не спостерігали ніякого впливу на стабільність білка, здійснюваного концентрацією

полісорбату 20 (PS20) в інтервалі від 0,005-0,06% (мас./об.), що було виявлено у вищеописаному статистичному аналізі (Фіг. 1-4).

- Відомо, що домішки пероксиду водню, що містяться у вихідному матеріалі полісорбату 20, можуть викликати окислювання триптофану (W) і метіоніну (M). L-гістидин також підвищує вищеописаний ризик окислювання. Зразки вибраного гіршого випадку композицій, що містять більш високі концентрації полісорбату 20 і L-гістидину, аналізували за допомогою пептидного картування. Результати аналізу показали, що навіть комбінація більш високої концентрації гістидину (25 мМ буфер ацетат гістидину) і більш високої кількості PS20 (0,06% PS20) не демонструвала значного ризику окислювання (Таблиця 5), і тому гістидиновий буфер придатний для застосування в композиції α -PD-L1.

Таблиця 5

Процент окислення Trp і M²⁵³ у вибраних композиціях за допомогою пептидної карти

	Вибрані композиції				% Окислення			
	Конц. (мг/мл)	Буфер (мМ)	PS20 (%)	Моменти часу	W CDR HC2	W CDR HC4	W CDR HC10	LC27 M253
F1	50	20 мМ His-Ace	0,04	T0	0,1	0,1	0,1	5,5
F3	40	20 мМ His-Ace	0,06	25C, 2M	0,2	0,2	0,2	6,4
F10	120	20 мМ His-Ace	0,06	25C, 2M	0,2	0,1	0,2	6,7
F11	50	25 мМ His-Ace	0,06	25C, 2M	0,2	0,2	0,2	6,6

Примітка: всі склади зберігали до 1 місяця при 40 °C; аналіз здійснювали з використанням пептидної карти.

W = триптофан; M = Метіонін.

- Для оцінки можливої деградації PS20 у композиції при зберіганні композиції F1-F10 (Таблиця 4 зберігали при 40 °C протягом 1 місяця, при 25 °C протягом 2 місяців, при 5 °C протягом 2 місяців або при 5 °C протягом 6 місяців. Не спостерігали ніякої деградації PS20 у тестованих композиціях при зберіганні при будь-якій з підвищених температур (тобто 40 °C і 25 °C) і при 5 °C. Зміна об'єму заповнення вибраних композицій (тобто F1, F2, F3 і F6) до 7 мл (високе заповнення) або до 4 мл (низьке заповнення) і потім зберігання при 5 °C протягом 6 місяців також не мало ніякого значного впливу на швидкість деградації PS20 (Фіг. 5).

- Утворення невидимих частинок (SbVP) у різних композиціях при зберіганні при 5 °C протягом 6 місяців оцінювали за допомогою аналізу HIAC, що було мірою стабільності (Таблиця 6). Не спостерігали ніяких вимірюваних змін у SbVP у тестованих композиціях.

Таблиця 6

HIAC-дані для утворення SbVP через 6 місяців зберігання при 5 °C

Зразок	Момент часу (місяць)	Розмір частинок (кумулятивна зустрічальність/мл)			
		2 мкМ	5 мкМ	10 мкМ	25 мкМ
F1	0	802	193	61	5
	6	1190	278	80	6
F2	0	799	146	43	12
	6	370	112	29	2
F3	0	485	133	34	4
	6	163	52	14	2
F4	0	211	65	31	8
	6	181	48	8	1
F5	0	872	359	195	79
	6	340	89	23	1
F6	0	233	61	16	3

Таблиця 6

НІАС-дані для утворення SbVP через 6 місяців зберігання при 5 °C

Зразок	Момент часу (місяць)	Розмір частинок (кумулятивна зустрічальність/мл)			
		2 мкМ	5 мкМ	10 мкМ	25 мкМ
F7	6	116	34	16	3
	0	134	29	13	4
	6	144	42	9	0
F8	0	433	118	34	1
	6	564	98	23	2
F9	0	498	114	17	1
	6	144	21	6	0
F10	0	610	124	23	0
	6	248	75	28	3

Примітка: два флакони з об'ємом 1 мл об'єднували разом для здійснення аналізу НІАС в малому об'ємі.

Стабільність композицій додатково досліджували з використанням експерименту заморожування/розморожування. Композиції F1-F10 (Таблиця 4) піддавали або п'яти циклам заморожування/розморожування під час зберігання при -20 °C, або зберігали при підвищеній температурі зберігання 5 °C від 0 до 6 місяців і потім аналізували за допомогою SEC і ICIEF на предмет процентного вмісту мономера α -PD-L1 (Фіг. 6A і B) і процентного вмісту головного піка в композиції (Фіг. 6C і D). Не спостерігали ніякої значної зміни процентного вмісту мономера і головного піка після циклів заморожування/розморожування і зберігання в зазначених часових точках.

Стабільність лікарської речовини в композиції F2 (Таблиця 4) оцінювали за допомогою проведення п'яти циклів заморожування/розморожування під час зберігання в невеликій банці з нержавіючої сталі при -20 °C протягом до 6 місяців з наступним вимірюванням стабільності за допомогою CAC, SEC і ICIEF (Таблиця 7). Не спостерігали ніяких змін після зберігання протягом 6 місяців при -20 °C.

Таблиця 7

Стабільність активної речовини в невеликих банках з нержавіючої сталі, які зберігали при -20 °C

Часові точки	З/Р-цикли	Q12005 CAC прозорість	Q12589 SEC (% мономера)	Q12631 ICIEF (% головного піка)
T0	0	CL/SY	98,6	80,1
1M	1	CL/SY	98,6	79,1
2M	2	CL/SY	98,7	80,2
3M	3	CL/SY	98,8	80,9
6M	5	CL/SY	98,6	80,2

Примітка: З/Р = заморожування/розморожування; SY = жовтуватий; CL = прозорий.

Стабільність активної речовини в композиції, що містить 100 мг/мл α -PD-L1, 20 мМ ацетату гістидину, 120 мМ сахарози, 0,04% PS20, pH 5,6, оцінювали за допомогою проведення трьох циклів заморожування/розморожування з наступним зберіганням у невеликій банці з нержавіючої сталі або зі сплаву "Хастеллой" при -20 °C, 5 °C або 25 °C протягом до 3 місяців з наступним вимірюванням стабільності за допомогою SEC (Фіг. 7A і B). Не спостерігали відмінностей між зберіганням у невеликій банці з нержавіючої сталі і зі сплаву "Хастеллой" при pH 5,6. Активна речовина залишалася стабільною терміном до 3 місяців при -20 °C після трьох циклів заморожування/розморожування. Незважаючи на відмінності між банками з нержавіючої сталі і зі сплаву "Хастеллой", вони обидві були придатні для використання для зберігання лікарської речовини.

Стабільність лікарського продукту в композиції, що містить 50 мг/мл α -PD-L1, 20 мМ ацетату гістидину, 120 мМ сахарози, 0,04% PS20, pH 5,6, оцінювали при зберіганні в об'ємі 16 мл,

заповненому у флакон об'ємом 20 мл, при -5 °C, 25 °C або 40 °C протягом до 3 місяців з наступним вимірювання стабільності за допомогою SEC і ICIEF (Фіг. 8A і B). Не спостерігали ніяких змін після зберігання протягом трьох місяців при 5 °C. Швидкість деградації pH 5,6 на місяць при 40 °C склала 0,66% і 22%, як визначено за допомогою аналізу SEC і ICIEF, відповідно.

Оцінка буфера в композиції F12 виявила, що буфер ацетату натрію забезпечував аналогічну стабільність білка, як і буфер ацетату гістидину, що з'ясували на основі швидкості деградації головного піка, виміряної за допомогою ексклюзійної ВЕРХ і ICIEF (Таблиця 8). Дві тестовані композиції являли собою 50 мг/мл α -PD-L1 у 20 мМ ацетату L-гістидину, 120 мМ сахарози і 0,04% (мас./об.) полісорбату 20 при pH 5,5 і 0 мг/мл α -PD-L1 у 20 мМ ацетату натрію, 120 мМ сахарози і 0,04% (мас./об.) полісорбату 20 при pH 5,5.

Таблиця 8

Нульовий порядок швидкості деградації α -PD-L1 для ICIEF і головного піка з використанням ексклюзійної ВЕРХ в буфері ацетату гістидину і в буфері ацетату натрію при 40 °C

Концентрація α -PD-L1 (мг/мл)	Швидкість зменшення % головного піка на місяць	
	ICIEF	Ексклюзійна ВЕРХ
Ацетат гістидину	23	0,67
Ацетат натрію	21	0,74

Примітка: всі композиції зберігали до 1 місяця при 40 °C.

Загалом, DoE-розроблені дослідження стабільності виявили, що при 40 °C не спостерігалось за допомогою ICIEF значного впливу концентрації на втрати головного піка, у той час як при більш низькому pH спостерігалася трохи більш висока швидкість втрати головного піка (Фіг. 1A-B). При 40 °C не спостерігали значних взаємодій за допомогою ексклюзійної ВЕРХ, однак композиції з більш високою концентрацією демонстрували більш швидку втрату мономера (Фіг. 3A-B). Також було виявлено, що при більш низькому pH має місце велика швидкість втрати мономера. Аналогічні результати спостерігали при 25 °C (Фіг. 2A-B і Фіг. 4A-B). Статистичний аналіз не знайшов особливо значимих взаємодій (зв'язків) між будь-якими з параметрів тестованих композицій.

Дослідження при збовтуванні і термічному стресі

Досліджували стабільність лікарського продукту в присутності підвищених концентрацій PS20 при впливі стресу збовтування в скляних флаконах. Композицію, що містить 57 мг/мл у 20 мМ ацетату гістидину, 120 мМ сахарози, pH 5,5, оцінювали в об'ємі 1 мл, заповненому в скляний флакон об'ємом 2 мл, з різними концентраціями PS20 в інтервалі від 0,005 до 0,06%. Скляні флакони збовтували при 70 об./хв. протягом 3 днів при кімнатній температурі перед вимірюванням стабільності за допомогою SEC (Фіг. 9A) і перед вимірюванням каламутності (Фіг. 9B). Композиція з PS20 на рівні в інтервалі 0,005-0,06% не мала змін у стабільності під час збовтування. Однак композиції, позбавлені PS20, демонстрували підвищення втрати мономера завдяки підвищенню кількості ВМЧ. У даному експерименті, 0,005% PS20 було достатньо для захисту від стресу збовтування в скляних флаконах.

Досліджували стабільність композицій лікарського продукту (Таблиця 4), який зберігали при різних температурах і часі і потім піддавали стресу збовтування в скляних флаконах. Кожну з композицій F1-F10 оцінювали в об'ємі 1 мл, який заповнювали в скляний флакон об'ємом 2 мл. Скляні флакони збовтували при 70 об./хв. протягом 1 дня при кімнатній температурі перед вимірюванням стабільності за допомогою SEC (Фіг. 10). У даному експерименті збовтування не впливало на стабільність лікарського продукту при зберіганні протягом тривалого часу при 40 °C, 25 °C або 5 °C.

З метою підтримання транспортування пакетів для внутрішньовенної ін'єкції, що часто відбувається в лікарнях, здійснювали дослідження стабільності при збовтуванні з α -PD-L1, включеним до складу разом з 20 мМ ацетатом гістидину, 240 мМ сахарозою, pH 5,5, з 0,005-0,02% (мас./об.) полісорбатом 20. Найбільш широко застосовувані пакети для внутрішньовенних ін'єкцій, а саме з полівінілхлориду об'ємом 250 мл (PVC) або з поліолефіну (PO), які містять ізотонічний розчин хлориду натрію (0,9% NaCl), оцінювали за допомогою введення 400-600 мг розчинів α -PD-L1 і збовтування їх з використанням орбітального шейкера при 100 об./хв. при 5 °C протягом до 6 годин. Результати дослідження на основі дозування по масі продемонстрували, що мінімум 0,015% (мас./об.) полісорбату 20 у розчині білка необхідно

для запобігання утворенню видимих частинок (пов'язаних з осадженням білка) під час транспортування (Таблиця 9). Крім того, для зменшення ризику деградації полісорбату 20 протягом терміну зберігання, концентрацію полісорбату 20 підвищували з 0,02% (мас./об.) до 0,04% (мас./об.).

5

Таблиця 9

Дослідження збовтування IV-пакета з різними кількостями PS20 в лікарському продукті α-PD-L1

% PS20 в DP	Зразки	CAC	ЕКСКЛЮЗІЙНА ВЕРХ		Невидимі частинки (мд/л)	
			% ВМЧ	% Мономера	≥10 мкм	≥25 мкм
0,005%	250 мл РО-пакет, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	250 мл РО-пакет, збовтування при 5 °C протягом 2 годин	Спостережувані видимі частинки Експеримент зупиняли	NT	NT	NT	NT
	250 мл PVC-пакет, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	250 мл PVC-пакет, збовтування при 5 °C протягом 2 годин	Спостережувані видимі частинки Експеримент зупиняли	NT	NT	NT	NT
0,01%	250 мл РО-пакет, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	250 мл РО-пакет, збовтування при 5 °C протягом 2 годин	Спостережувані видимі частинки Експеримент зупиняли	NT	NT	NT	NT
	250 мл PVC-пакет, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	250 мл PVC-пакет, збовтування при 5 °C протягом 4 годин	CO, CL, PFVP	T	NT	NT	NT
	250 мл РО-пакет, T0	CO, CL, PFVP	1,2	98,8	21	2
	250 мл РО-пакет, збовтування при 5 °C протягом 4 годин	CO, CL, PFVP	1,3	98,7	195	19
0,015%	250 мл PVC-пакет, T0	CO, CL, PFVP	1,2	98,8	16	0
	250 мл PVC-пакет, збовтування при 5 °C протягом 4 годин	CO, CL, PFVP	1,2	98,8	24	2

Примітка: всі композиції 50мг/мл α-PD-L1 в 20 мМ ацетату L-гістидину, 240 мМ сахарози, при рН

5,5. Аналіз здійснювали з використанням ексклюзійної ВЕРХ. NT = не тестували; CAC = колір, зовнішній вигляд і прозорість; CO = безбарвний; CL = прозорий; PFVP = практично вільний від видимих частинок.

Оцінка стабільності композицій α-PD-L1

Проводили скринінг рН на матеріалах, одержаних з Master Cell Bank і з Working Cell Bank, рН в інтервалі 5,2-6,3 у композиції, що містить 20 мМ ацетату гістидину, 120 мМ сахарози і 0,04% PS20 (Таблиця 10).

10

Аналіз за допомогою ексклюзійної ВЕРХ і ICIEF продемонстрував, що при рН 5,7-6,3 композиції були хімічно і фізично стабільні, і допустимий інтервал рН 5,5-6,3 у композиції є придатним (Фіг. 11А і В). При більш високому значенні рН зменшувалися швидкості деградації мономера і головного піка, причому швидкості вирівнювалися при рН приблизно 5,7 і 6,3.

15

Таблиця 10

Скринінг рН композицій

Концентрація (мг/мл)	рН	Контейнер	Температура (°C)	Часові точки
120	5,2, 5,7, 6, 6,3	1 мл заповнювали в 2-мл флакон	40	T0, 1 тиждень, 2 тижні, 1 місяць
40	5,2, 5,7, 6, 6,3	1 мл заповнювали в 2-мл флакон	40	T0, 1 тиждень, 2 тижні, 1 місяць

Досліджували ефект допоміжних речовин композиції відносно окислювання триптофану (W) і метіоніну (M) у композиціях α -PD-L1. Пептидне картування продемонструвало, що значного підвищення окислювання не спостерігалось. Композиції, що містять 20 мМ ацетату гістидину, 120 мМ сахарози, 0,04% PS20 з розчином рН 5,8, продемонстрували відсутність явного підвищення окислювання триптофану і метіоніну при зберіганні композиції протягом одного місяця при підвищених температурах як для лікарського продукту, так і для лікарської речовини (Таблиця 11).

Таблиця 11

Процент окислення Trp і M²⁵³ і M⁴²⁹ у вибраних композиціях за допомогою пептидної карти

Зразок	% Окислення				
	W CDR H2	W CDR H4	W CDR H10	M ²⁵³	M ⁴²⁹
DP, 50 мг/мл, T0	0,35	0,26	0,12	4,86	0,92
DP, 50 мг/мл, 40 °C, T = 1M	0,63	0,26	0,31	5,85	1,10
DS, 100 мг/мл, SS, 25 °C, T = 1M	0,52	0,27	0,28	5,61	1,17

Примітка: всі композиції α -PD-L1 містили 20 мМ ацетату L-гістидину, 120 мМ сахарози, 0,04% PS20, рН 5,8.

На основі результатів цих досліджень композицій і статистичного аналізу для клінічних досліджень була вибрана рідка композиція, що складається з 60 мг/мл α -PD-L1 у 20 мМ ацетату гістидину, 120 мМ сахарози, 0,04% полісорбату 20 з цільовим рН 5,8.

Дозування для клінічних випробувань проводили з постійною дозою 1200 мг α -PD-L1 на пацієнта. Конфігурацію флаконів номінальним об'ємом 20 мл заповнення (1200 мг α -PD-L1) вибирали для виявлення профілю цільового продукту.

Дослідження заморожування/розморожування проводили з призначеною композицією, що містить 60 мг/мл α -PD-L1 у 20 мМ ацетату L-гістидину, 120 мМ сахарози і 0,02% (мас./об.) полісорбату 20 при рН 5,8. Результати аналізу після п'яти циклів заморожування/розморожування підтвердили, що 120 мМ сахароза захищала α -PD-L1 від агрегації, індукованої заморожуванням/розморожуванням (Таблиця 12). Аналогічно, для тривалої стабільності призначеної рідкої композиції виявили, що вона стабільна протягом більше 6 місяців при 2-8 °C (Таблиця 13). Безупинне відстеження протягом близько 36 місяців здійснюється для даної композиції на даний час. Цільова композиція і тестовані інтервали дослідження для лікарського продукту і лікарської речовини α -PD-L1 представлені в Таблиці 14.

Таблиця 12

Репрезентативні дані стабільності при заморожуванні/розморожуванні для дослідної партії лікарської речовини α -PD-L1

№ Цикли заморожування/розморожування	CAC	Концентрація (мг/мл)	pH	ICIEF			ЕКСКЛЮЗИЙНА ВЕРХ			CE SDS NGS (не восстановленный)			Ефективність (% специфічної активності)
				Кислотна ділянка (площа %)	Головний пік (площа %)	Основна ділянка (площа %)	Сукупність форм ВМЧ (площа %)	Мономер (площа %)	Сукупність форм НМЧ (площа %)	Сукупність пре-пиків (% CPA)	Головний пік (% CPA)	Сукупність пост-пиків (% CPA)	
Недоступно	CL/SY/PFVP	60,1	5,9	19	78	3	0,5	99,4	0,1	2,9	97	0,1	107
5	CL/SY/PFVP	62	5,9	20	77	3	0,5	99,4	0,1	2,7	97,1	0,2	111

Примітка: партія PP400L-02142013 містить 60 мг/мл α -PD-L1 в 20 мМ ацетату L-гістидину, 120 мМ сахарози і 0,04% (мас./об.) полісорбату 20 при pH 5,8. CL = прозорий; SY= жовтуватий; PFVP = практично вільний від видимих частинок; NA = недоступно, ICIEF = капілярне ізоелектричне фокусування під контролем зображення; CE-SDS = капілярний електрофорез з додецилсульфатом натрію; ВМЧ = високомолекулярні частинки; НМЧ = низькомолекулярні частинки.

Таблиця 13

Дані стабільності для дослідної партії лікарського засобу α -PD-L1

Темп. (°C)	Час (дні/місяці)	CAC	pH	Концентрація (мг/мл)	Зображений cIEF			ЕКСКЛЮЗИЙНА ВЕРХ			CE SDS NGS (невідновлений)			Ефективність (% специфічної активності)	Невидимі частинки ^a (мд/л)	
					Кислотна ділянка (площа %)	Головний пік (площа %)	Основна ділянка (площа %)	Сукупність форм ВМЧ (площа %)	Пік мономера (площа %)	Сукупність форм НМЧ (площа %)	Сукупність пре-пиків (% CPA)	Головний пік (% CPA)	Сукупність пост-пиків (% CPA)		≥10 мкм	≥25 мкм
Недоступно	T = 0/0	SY/CL/PFVP	5,9	59,9	18,1	78,9	2,9	0,6	99,3	0,1	2,7	97	0,3	99	37	30
5	30/1	SY/CL/PFVP	5,9	59,9	18,3	78,6	3,1	0,6	99,3	0,1	2,7	96,9	0,4	NT	26	2
5	61/2	SY/CL/PFVP	5,9	61,7	18,4	78,9	2,7	0,7	99,3	0,1	2,8	96,9	0,4	NT	3	0
5	91/3	SY/CL/PFVP	5,9	61,7	17,1	80,1	2,8	0,7	99,2	0,1	2,7	97	0,4	102	18	3
5	183/6	SY/CL/PFVP	5,9	60,8	18,4	78,6	3	0,7	99,2	0,1	3,1	96,5	0,4	101	3	0

Партія PP400L-02142013-DP містить 60 мг/мл α -PD-L1 в 20 мМ ацетату L-гістидину, 120 мМ сахарози і 0,04% (мас./об.) полісорбату 20 при pH 5,8. NA = недоступно; CAC = колір, зовнішній вигляд і прозорість; SY = жовтуватий, CL = прозорий, PFVP = практично вільний від видимих частинок; ВМЧ = високомолекулярні частинки; НМЧ = низькомолекулярні частинки; ICIEF = капілярне ізоелектричне фокусування під контролем зображення; CE-SDS = капілярний електрофорез з додецилсульфатом натрію; NT = не тестували.

Таблиця 14

Цільова композиція і тестовані інтервали дослідження для лікарської речовини і лікарського продукту α -PD-L1

Параметр	Мішень	Тестовані інтервали композиції
Концентрація α -PD-L1	60 мг/мл	40-120 мг/мл
Концентрація ацетату L-гістидину	20 мМ	20 мМ
pH розчину	5,8	5-6
Концентрація сахарози	120 мМ	0-240 мМ
Концентрація полісорбату 20 (мас./об.)	0,04%	0,005-0,06% ^a

Оскільки лікарський продукт α -PD-L1 (60 мг/мл) буде вводиться за допомогою інфузії після розведення в ізотонічному розчині хлориду натрію (0,9% NaCl), то тестували сумісність і стабільність активного інгредієнта при наступних модельованих умовах одержання і введення: 1) розведення лікарського продукту α -PD-L1 у інфузійних пакетах, що містять 0,9% NaCl, в інтервалі 2,4-9,6 мг/мл (номінальна концентрація після розведення), щоб перекрити інтервал дозувань у клінічному дослідженні; 2) короткочасне експонування з інфузійними пакетами, що містять ізотонічний розчин хлориду натрію (матеріал поверхні контакту пакета і продукту складається з PVC (полівінілхлорид) або поліолефіну); 3) використання пристроїв для внутрішньовенної інфузії (поверхні, що контактують з продуктом, PVC або поліолефін); і 4) використання вбудованих фільтрів 0,2 мкм (мембрана фільтра PES).

Зразки тестували через 24 години зберігання при 2-8 °C або через 24 години при 30 °C з експонуванням під розсіяним освітленням. Зразки тестували з використанням придатних методів виявлення стабільності, що включають: визначення чистоти за допомогою ексклюзивної ВЕРХ і ІСІЕФ, концентрації білка (за допомогою УФ), невидимих частинок за допомогою методу світлотіні, кольору, прозорості/опалесцентності і pH (Таблиця 15).

Таблиця 15

Стабільність α -PD-L1, який розводили і зберігали при 5 °C або 30 °C протягом 24 годин в пакетах для інфузії 0,9% NaCl разом або без вбудованих фільтрів 0,2 мкм

Зразок	CAC	Концентрація (мг/мл)	Каламутність А350	ІСІЕФ			ЕКСКЛЮЗИВНА ВЕРХ			pH	Частинки (кількість /мл)	
				% Кислотних компонентів	% Головного піка	% Основних компонентів	% ВМЧ	% Мономера	% НМЧ		≥10 мкм	≥25 мкм
2,4 мг/мл в PVC-пакеті, T0	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	19,5	75,7	4,8	0,4	99,5	0,1	5,9	25	1
2,4 мг/мл в PVC-пакеті, t=5 °C, 24 годин перед інфузією	CL, CO, PFVP	2,2	0,02	19,6	75,5	4,9	0,4	99,5	0,1	5,8	32	0
2,4 мг/мл в PVC-пакеті, t=30 °C, 24 години перед інфузією	CL, CO, PFVP	2,2	0,01	19,3	76,6	4,1	0,3	99,5	0,1	5,8	32	0
2,4 мг/мл в PVC-пакеті, t=5 °C, 24 години	CL, CO, PFVP	2,1	0,04	19,5	76,4	4,1	0,4	99,5	0,1	5,8	44	1

Таблиця 15

Стабільність α -PD-L1, який розводили і зберігали при 5 °C або 30 °C протягом 24 годин в пакетах для інфузії 0,9% NaCl разом або без вбудованих фільтрів 0,2 мкм

Зразок	CAC	Концентрація (мг/мл)	Каламутність A350	ICIEF			ЕКСКЛЮЗІЙНА ВЕРХ			pH	Частинки (кількість /мл)	
				% Кислотних компонентів	% Головного піка	% Основних компонентів	% ВМЧ	% Мономера	% НМЧ		≥10 мкм	≥25 мкм
пропускали через інфузійний пристрій без вбудованого фільтра												
2,4 мг/мл в PVC-пакеті, t=5 °C, 24 години пропускали через інфузійний пристрій з вбудованим фільтром	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	19,3	76,7	4,1	0,3	99,5	0,1	5,9	4	0
2,4 мг/мл в PVC-пакеті, t=30 °C, 24 години пропускали через інфузійний пристрій без вбудованого фільтра	CL, CO, PFVP	2,1	0,02	20	75,7	4,3	0,3	99,6	0,1	5,9	29	0
2,4 мг/мл в PVC-пакеті, t=30 °C, 24 години пропускали через інфузійний пристрій з вбудованим фільтром	CL, CO, PFVP	2	0,04	19,5	76,4	4,1	0,3	99,6	0,1	6	5	0

Таблиця 15 (продовж.)

Стабільність α -PD-L1, який розводили і зберігали при 5 °C або 30 °C протягом 24 годин в інфузійних пакетах 0,9% NaCl разом або без вбудованих фільтрів 0,2 мкм

Зразок	CAC	Концентрація (мг/мл)	Каламутність A350	ICIEF			ЕКСКЛЮЗІЙНА ВЕРХ			pH	Частинки (кількість /мл)	
				% Кислотних компонентів	% Головного піка	% Основних компонентів	% ВМЧ	% Мономера	% НМЧ		≥10 мкм	≥25 мкм
2,4 мг/мл в РО-пакеті, T0	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	18,6	77,3	4,1	0,4	99,5	0,1	6,1	5	0
2,4 мг/мл в РО-пакеті, t=5 °C, 24 години перед інфузією	CL, CO, PFVP	2,1	0,03	17,8	77,8	4,4	0,4	99,5	0,1	5,9	3	0
2,4 мг/мл в РО-пакеті, t=30 °C, 24 години перед інфузією	CL, CO, PFVP	2,1	0,02	20,6	75,3	4,1	0,3	99,5	0,1	5,9	8	0
2,4 мг/мл в РО-пакеті, t=5 °C, 24 години пропускали через інфузійний пристрій без вбудованого фільтра	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	20,5	75,3	4,2	0,4	99,5	0,1	5,9	48	0
2,4 мг/мл в РО-пакеті, t=5 °C, 24 години пропускали через інфузійний пристрій з вбудованим фільтром	CL, CO, PFVP	2,1	0,02	21,0	74,8	4,3	0,4	99,5	0,1	5,9	1	0
2,4 мг/мл в РО-пакеті, t=30 °C, 24 години пропускали через інфузійний пристрій без вбудованого фільтра	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	18,7	76,9	4,4	0,3	99,5	0,1	5,9	22	0
2,4 мг/мл в РО-пакеті, t=30 °C, 24 години	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	21,2	73,9	4,9	0,4	99,5	0,1	6	0	0

Таблиця 15 (продовж.)

Стабільність α -PD-L1, який розводили і зберігали при 5 °C або 30 °C протягом 24 годин в інфузійних пакетах 0,9% NaCl разом або без вбудованих фільтрів 0,2 мкм

Зразок	CAC	Концентрація (мг/мл)	Каламутність A350	ICIEF			ЕКСКЛЮЗІЙНА ВЕРХ			pH	Частинки (кількість /мл)	
				% Кислотних компонентів	% Головного піка	% Основних компонентів	% ВМЧ	% Мономера	% НМЧ		≥10 мкм	≥25 мкм
пропускали через інфузійний пристрій з вбудованим фільтром												

CO = безбарвний, CL= прозорий, PFVP = практично вільний від видимих частинок, A350 = поглинання при 350 нм.

Таблиця 15 (продовж.)

Стабільність α -PD-L1, який розводили і зберігали при 5 °C або 30 °C протягом 24 годин в інфузійних пакетах 0,9% NaCl разом або без вбудованих фільтрів 0,2 мкм

Зразок	CAC	Концентрація (мг/мл)	Каламутність A350	ICIEF			ЕКСКЛЮЗІЙНА ВЕРХ			pH	Частинки (кількість /мл)	
				% Кислотних компонентів	% Головного піка	% Основних компонентів	% ВМЧ	% Мономера	% НМЧ		≥10 мкм	≥25 мкм
9,6 мг/мл в PVC-пакеті, T0	CL, CO, PFVP	8,7	0,05	18,3	77,3	4,4	0,4	99,5	0,1	5,9	35	0
9,6 мг/мл в PVC-пакеті, t=5 °C, 24 години перед інфузією	CL, CO, PFVP	8,6	0,03	19,0	76,8	4,2	0,4	9,5	0,1	5,9	6	1
9,6 мг/мл в PVC-пакеті, t=30 °C, 24 години перед інфузією	CL, CO, PFVP	8,5	0,05	18,9	77	4,1	0,4	99,5	0,2	5,9	10	0
9,6 мг/мл в PVC-пакеті, t=5 °C, 24 години пропускали через інфузійний пристрій без вбудованого фільтра	CL, CO, PFVP	8,8	0,03	19,2	76,4	4,4	0,3	99,6	0,1	6	29	0
9,6 мг/мл в	CL, CO,	8,7	0,06	19,0	77,1	3,9	0,3	99,6	0,1	5,9	18	0

Таблиця 15 (продовж.)

Стабільність α -PD-L1, який розводили і зберігали при 5 °C або 30 °C протягом 24 годин в інфузійних пакетах 0,9% NaCl разом або без вбудованих фільтрів 0,2 мкм

Зразок	CAC	Концентрація (мг/мл)	Кала- мут- ність A350	ICIEF			ЕКСКЛЮЗИЙНА ВЕРХ			pH	Частинки (кількість /мл)	
				% Кислот- них компо- нентів	% Голов- ного піка	% Основ- них компо- нентів	% ВМЧ	% Моно- мера	% НМЧ		≥10 мкм	≥25 мкм
PVC-пакеті, t=5 °C, 24 години пропускали через інфузійний пристрій з вбудованим фільтром	PFVP											
9,6 мг/мл в PVC-пакеті, t=30 °C, 24 години пропускали через інфузійний пристрій без вбудованого фільтра	CL, CO, PFVP	8,1	0,04	19,1	76,6	4,3	0,4	99,5	0,2	6	8	0
9,6 мг/мл в PVC-пакеті, t=30 °C, 24 години пропускали через інфузійний пристрій з вбудованим фільтром	CL, CO, PFVP	8,8	0,04	19,6	76,4	4	0,3	99,6	0,1	5,9	19	2
9,6 мг/мл в РО-пакеті, T0	CL, CO, PFVP	8,4	0,03	18,6	78	3,4	0,4	99,5	0,1	5,8	33	2
9,6 мг/мл в РО-пакеті, t=5 °C, 24 години перед інфузією	CL, CO, PFVP	8,6	0,04	19,2	76,4	4,4	0,4	99,5	0,1	5,9	32	0
9,6 мг/мл в РО-пакеті, t=30 °C, 24 години перед інфузією	CL, CO, PFVP	8,7	0,04	19,3	76,7	4	0,4	99,5	0,1	5,9	18	0
9,6 мг/мл в РО-пакеті, t=5 °C, 24 години пропускали через	CL, CO, PFVP	8,5	0,05	19,8	75,8	4,5	0,4	99,5	0,1	5,9	38	1

Таблиця 15 (продовж.)

Стабільність α -PD-L1, який розводили і зберігали при 5 °C або 30 °C протягом 24 годин в інфузійних пакетах 0,9% NaCl разом або без вбудованих фільтрів 0,2 мкм

Зразок	CAC	Концентрація (мг/мл)	Каламутність A350	ICIEF			ЕКСКЛЮЗИЙНА ВЕРХ			pH	Частинки (кількість /мл)	
				% Кислотних компонентів	% Головного піка	% Основних компонентів	% ВМЧ	% Мономера	% НМЧ		≥10 мкм	≥25 мкм
інфузійний пристрій без вбудованого фільтра												
9,6 мг/мл в РО-пакеті, t=5 °C, 24 години пропускали через інфузійний пристрій з вбудованим фільтром	CL, CO, PFVP	8,2	0,04	18,6	77,2	4,3	0,3	99,5	0,1	5,8	8	0
9,6 мг/мл в РО-пакеті, t=30 °C, 24 години пропускали через інфузійний пристрій без вбудованого фільтра	CL, CO, PFVP	8,5	0,03	19,4	76	4,6	0,4	99,5	0,1	5,9	48	7
9,6 мг/мл в РО-пакеті, t=30 °C, 24 години пропускали через інфузійний пристрій з вбудованим фільтром	CL, CO, PFVP	8,0	0,05	19,7	76,1	4,2	0,3	99,5	0,1	5,8	10	0

CO = безбарвний, CL = прозорий, PFVP = практично вільний від видимих частинок, A350 = поглинання при 350 нм.

Таблиця 16

Стабільність при збовтуванні α -PD-L1, розведеного в 0,9% NaCl
в інфузійних пакетах при 5 °C протягом до 6 годин

Зразок	CAC	Концентрація (мг/мл)	Кала- мут- ність A350	ICIEF			ЕКСКЛЮЗІЙНА ВЕРХ			pH	Частинки (кількість /мл)	
				% Кислот- них компо- нентів	% Голов- ний пік	% Основ- них компо- нентів	% ВМЧ	% Моно- мера	% НМЧ		≥10 мкм	≥25 мкм
2,4 мг/мл в РО-пакеті, T0	CL, CO, PFVP	2,13	0,02	17,5	79,1	3,4	0,8	99,1	0,1	5,9	3	0
2,4 мг/мл в РО-пакеті, 2 години збовтування	CL, CO, PFVP	2,09	0,01	17,1	79,8	3,1	0,8	99,1	0,1	5,9	113	2
2,4 мг/мл в РО-пакеті, 4 години збовтування	CL, CO, PFVP	2,12	0,02	17,3	79,6	3,1	0,8	99,1	0,1	5,9	31	0
2,4 мг/мл в РО-пакеті, 6 годин збовтування	CL, CO, PFVP	2,02	0,02	16,8	79,6	3,6	0,8	99,1	0,1	5,9	4	1
2,4 мг/мл в РО-пакеті, T0	CL, CO, PFVP	2,42	0,02	17,9	78,6	3,5	0,8	99,1	0,1	5,9	6	0
2,4 мг/мл в РО-пакеті, 2 години збовтування	CL, CO, PFVP	2,04	0,02	17,6	79,2	3,2	0,8	99,1	0,1	5,9	22	1
2,4 мг/мл в РО-пакеті, 4 години збовтування	CL, CO, PFVP	2,10	0,03	18,5	78	3,6	0,8	99,1	0,1	5,9	22	1
2,4 мг/мл в РО-пакеті, 6 годин збовтування	CL, CO, PFVP	2,05	0,01	18,6	78,2	3,3	0,8	99,1	0,1	5,9	10	0

CO = безбарвний, CL = прозорий, PFVP = практично вільний від видимих частинок, A350 = поглинання при 350 нм.

Продукт, тестований у дослідженнях модельованого введення, як описано вище, залишався фізично і хімічно стабільним при тестованих умовах. Пакети для інфузії, пристрої для інфузії, фільтри і/або допоміжні засоби для внутрішньовенного введення, що складаються з різних матеріалів, які містять продукт, додавали після успішної перевірки.

Додатково до статистичної стабільності здійснювали дослідження ефекту збовтування в пакеті для внутрішньовенного введення, що здійснювали з α -PD-L1, включеним до складу разом з 20 мМ ацетатом гістидину, 120 мМ сахарозою, pH 5,8, разом з 0,02 % PS20, що потенційно являє собою найнижчий рівень PS20, який може спостерігатися в лікарському продукті протягом терміну зберігання. Збовтування здійснювали при 2-8 °C з використанням орбітального шейкера при швидкості 100 об./хв. Дані передбачають, що при вмісті 0,02 % PS20 у лікарському продукті, α -PD-L1 залишається стабільний при збовтуванні при 5 °C після розведення в пакетах для внутрішньовенного введення (Таблиця 16).

Послідовності антитіла, використовувані в Прикладах
Варіабельна ділянка легкого ланцюга α -PD-L1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:7).

Варіабельна ділянка важкого ланцюга α -PD-L1

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEWVAVISPYGGSTYYADS
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSSASTK (SEQ ID
NO:8).

Повнорозмірний легкий ланцюг α -PD-L1

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:9).

Повнорозмірний важкий ланцюг α -PD-L1

15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEWVAVISPYGGSTYYADS
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:10).

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Genentech, Inc.

<120> КОМПОЗИЦІЇ, ЯКІ МІСТЯТЬ АНТИТІЛО ДО PDL1

<130> 146392022040

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 61/883,953

<151> 2013-09-27

<160> 36

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 1

Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala	Val	Ala
1				5					10	

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 2

Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser
1				5		

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 3

Gln	Gln	Tyr	Leu	Tyr	His	Pro	Ala	Thr
1				5				

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 5

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15
Lys Gly

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 6

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 7

<211> 108

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 8

<211> 122

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 8

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Ser
			20					25					30		
Trp	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Trp	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Arg	His	Trp	Pro	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys						
			115					120							

<210> 9

<211> 214

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 9

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala
			20					25				30			
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40				45				
Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55				60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Leu	Tyr	His	Pro	Ala
				85					90				95		
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
			100					105					110		
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
		115					120					125			
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
	130				135						140				
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145					150					155					160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
			165						170					175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
			180					185					190		
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
		195					200					205			
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
			210												

<210> 10

<211> 447

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 10

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Ser
			20					25					30		
Trp	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Trp	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90				95		
Ala	Arg	Arg	His	Trp	Pro	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
		115					120					125			
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
	130				135						140				
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145					150					155					160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
				165					170					175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
			180					185					190		
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
	195						200					205			
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
	210				215						220				
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
225					230					235					240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
			245						250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
			260					265					270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
	275						280					285			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
	290					295					300				
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
305					310					315					320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
			325						330					335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
		340						345					350		
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		355					360					365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
	370					375					380				
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390					395					400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
			405						410					415	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
		420					425						430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
		435					440						445		

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична конструкція

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> 6
 <223> Xaa = D або G

<400> 11
 Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Ser Trp Ile His
 1 5 10

<210> 12
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична конструкція

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> 4
 <223> Xaa = S або L

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> 10
 <223> Xaa = T або S

<400> 12
 Ala Trp Ile Xaa Pro Tyr Gly Gly Ser Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична конструкція

<400> 13
 Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 14
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична конструкція

```

<400> 14
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20          25

```

```
<210> 15
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
```

<220>
<223> Синтетична конструкція

```

<400> 15
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 1             5             10

```

```
<210> 16
<211> 32
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
```

<220>
<223> Синтетична конструкція

```

<400> 16
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1          5          10          15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20          25          30

```

```
<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
```

<220>
<223> Синтетична конструкція

<400> 17
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
1 5 10

```
<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
```

<220>
<223> Синтетична конструкція

```
<220>
<221> BAPIAHT
<222> 5
<223> Xaa = D aBo V
```

<220>
<221> BAPIAHT

```

<222> 6
<223> Xaa = V або I

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 7
<223> Xaa = S або N

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 9
<223> Xaa = A або F

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 10
<223> Xaa = V або L

<400> 18
Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Ala
 1           5           10

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична конструкція

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 4
<223> Xaa = F або T

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 6
<223> Xaa = Y або A

<400> 19
Ser Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser
 1           5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична конструкція

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 3
<223> Xaa = Y, G, F або S

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 4
<223> Xaa = L, Y, F або W

```

<220>
 <221> BAPIAHT
 <222> 5
 <223> Xaa = Y, N, A, T, G, F або I

<220>
 <221> BAPIAHT
 <222> 6
 <223> Xaa = H, V, P, T або I

<220>
 <221> BAPIAHT
 <222> 8
 <223> Xaa = A, W, R, P або T

<400> 20
 Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
 1 5

<210> 21
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична конструкція

<400> 21
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична конструкція

<400> 22
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 23
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична конструкція

<400> 23
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 24

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична конструкція

<400> 24
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична конструкція

<400> 25
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
 1 5 10

<210> 26
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична конструкція

<400> 26
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична конструкція

<400> 27
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична конструкція

<400> 28
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична конструкція

<400> 29
 Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
 1 5

<210> 30
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична конструкція

<400> 30
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 31
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична конструкція

<400> 31
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 32
<211> 118
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична конструкція

<400> 32
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична конструкція

<400> 33
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 34
<211> 30
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична конструкція

<400> 34
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 35
<211> 14
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 35

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

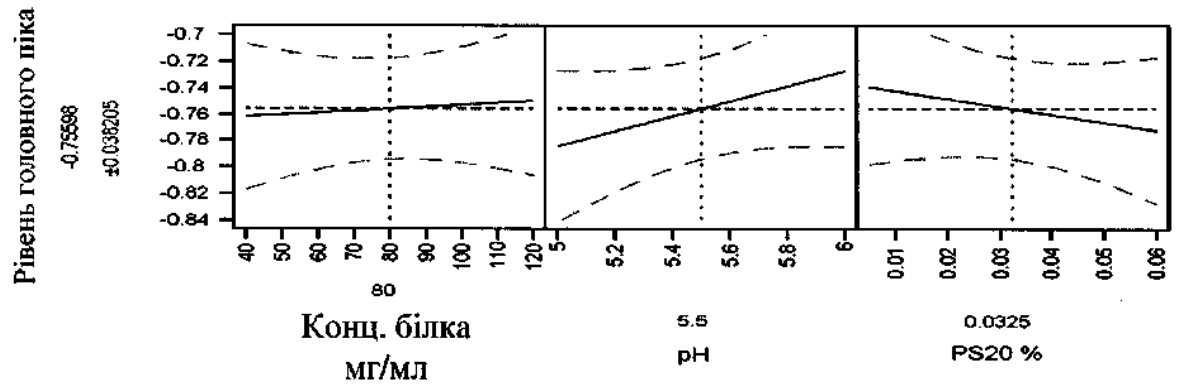
<223> Синтетична конструкція

<400> 36

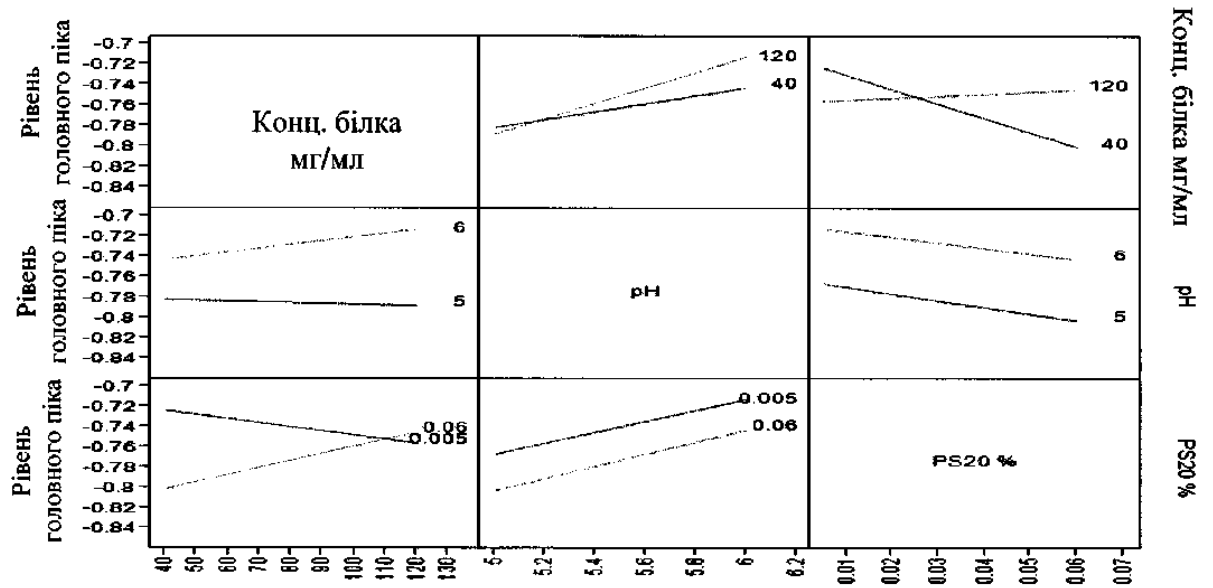
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

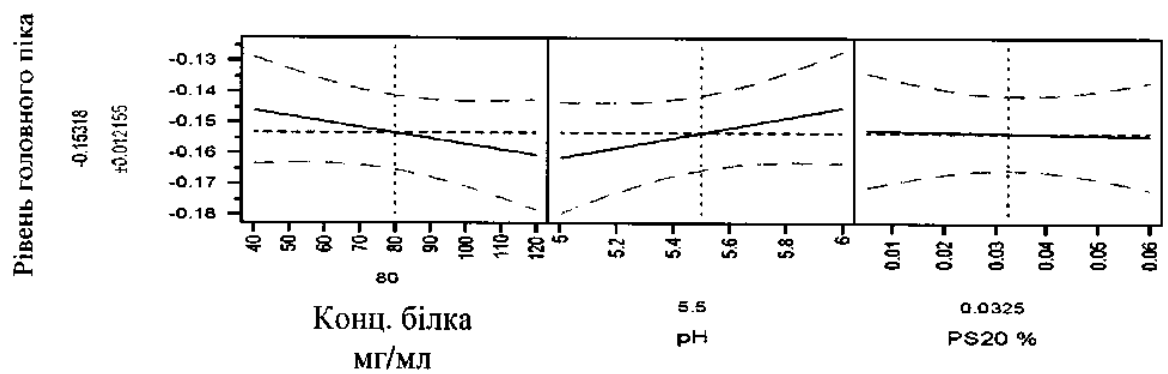
- 5 1. Водна фармацевтична композиція, яка містить моноклональне антитіло до PD-L1 у концентрації 60 мг/мл, ацетат гістидину у концентрації 20 мМ, сахарозу в концентрації 120 мМ, полісорбат 20 у концентрації 0,04 % (мас./об.) і має рН 5,8, у якій зазначене моноклональне антитіло являє собою повнорозмірне антитіло, і у якій зазначене моноклональне антитіло містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:9, і важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10.
- 10 2. Композиція за п. 1, у якій зазначене моноклональне антитіло зберігають у скляному флаконі або в контейнері з металевого сплаву.
3. Композиція за п. 2, у якій металевий сплав являє собою нержавіючу сталь 316L або сплав "Хастеллой".
- 15 4. Композиція за будь-яким з пп. 1-3, де композиція стабільна при 2-8 °С протягом щонайменше 6 місяців.
5. Композиція за будь-яким з пп. 1-3, де композиція стабільна при 2-8 °С протягом щонайменше 12 місяців.
6. Композиція за будь-яким з пп. 1-3, де композиція стабільна при 2-8 °С протягом щонайменше 18 місяців.
- 20 7. Композиція за будь-яким з пп. 1-3, де композиція стабільна при 2-8 °С протягом щонайменше 24 місяців.
8. Композиція за будь-яким із пп. 4-7, у якій антитіло у композиції зберігає після зберігання щонайменше 80 % своєї біологічної активності.
- 25 9. Композиція за п. 8, у якій біологічну активність вимірюють шляхом зв'язування антитіла з PD-L1.
10. Композиція за будь-яким з пп. 1-9, яка є стерильною.
11. Композиція за будь-яким з пп. 1-10, яка придатна для введення об'єкту.
12. Композиція за будь-яким з пп. 1-11 для внутрішньовенного (IV) введення.



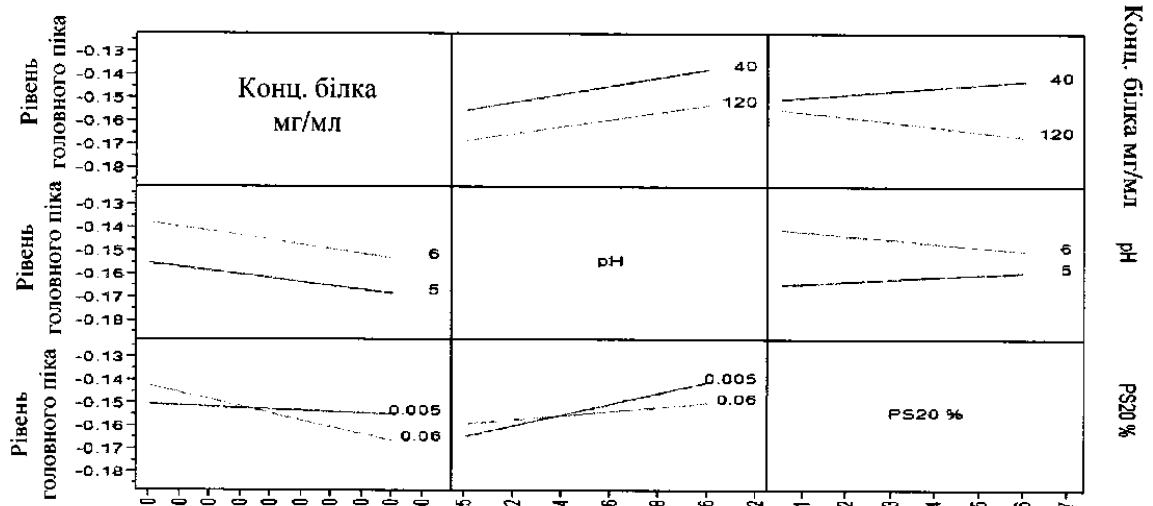
Фіг. 1А



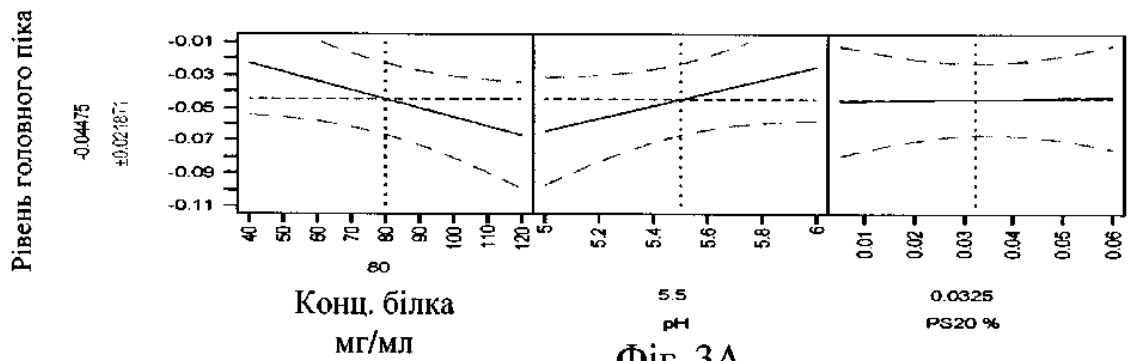
Фіг. 1В



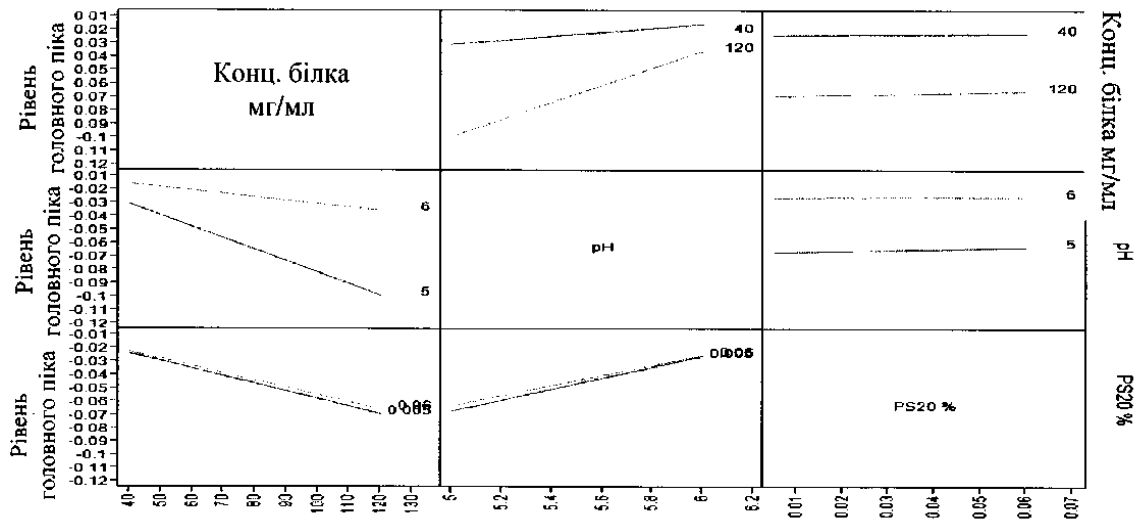
Фіг. 2А



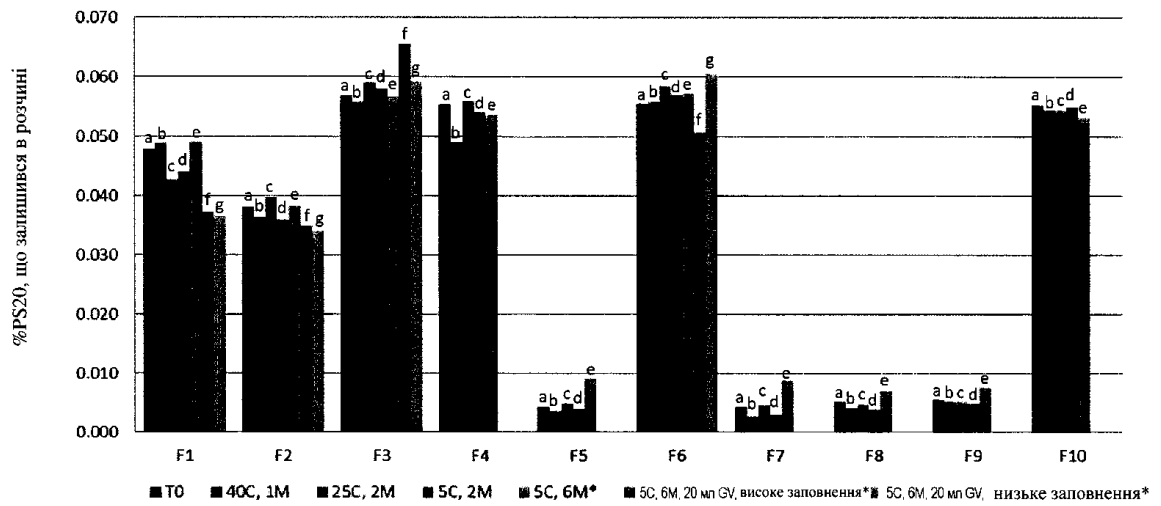
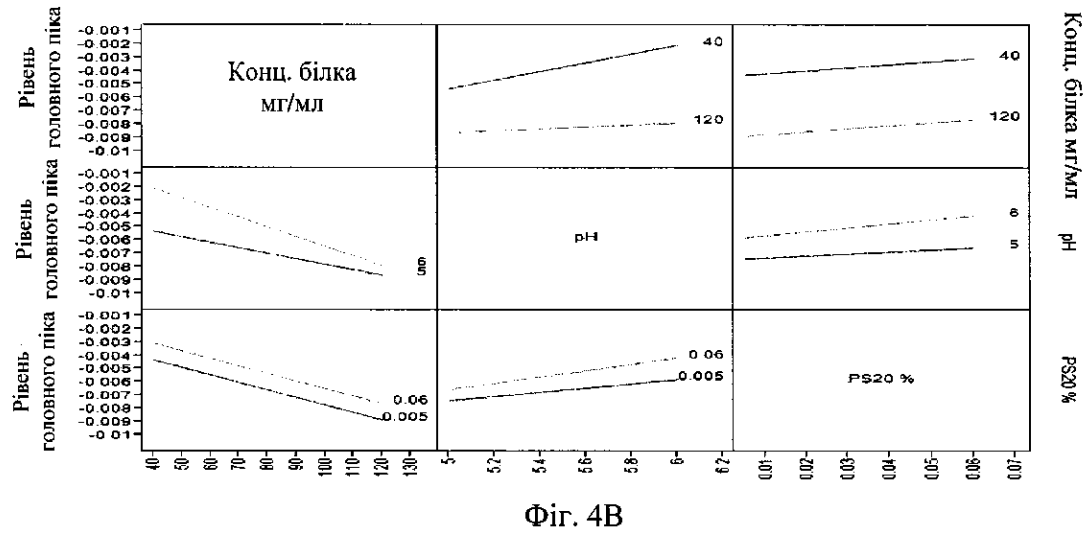
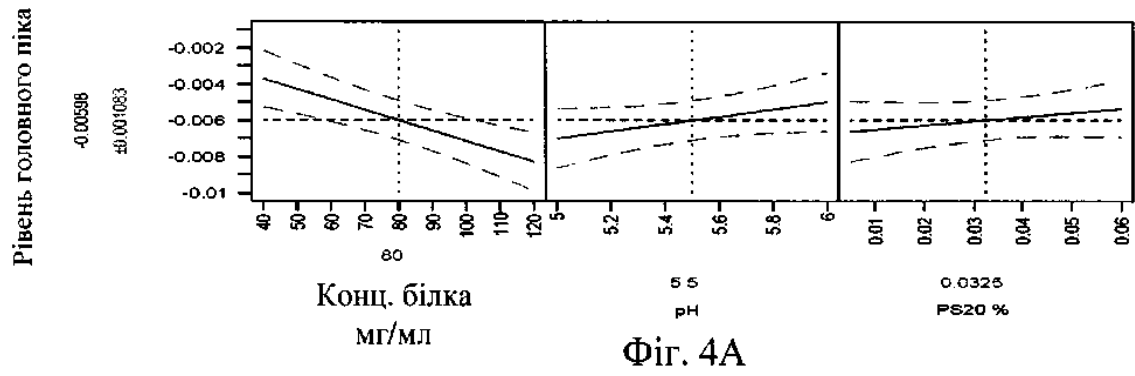
Фіг. 2В



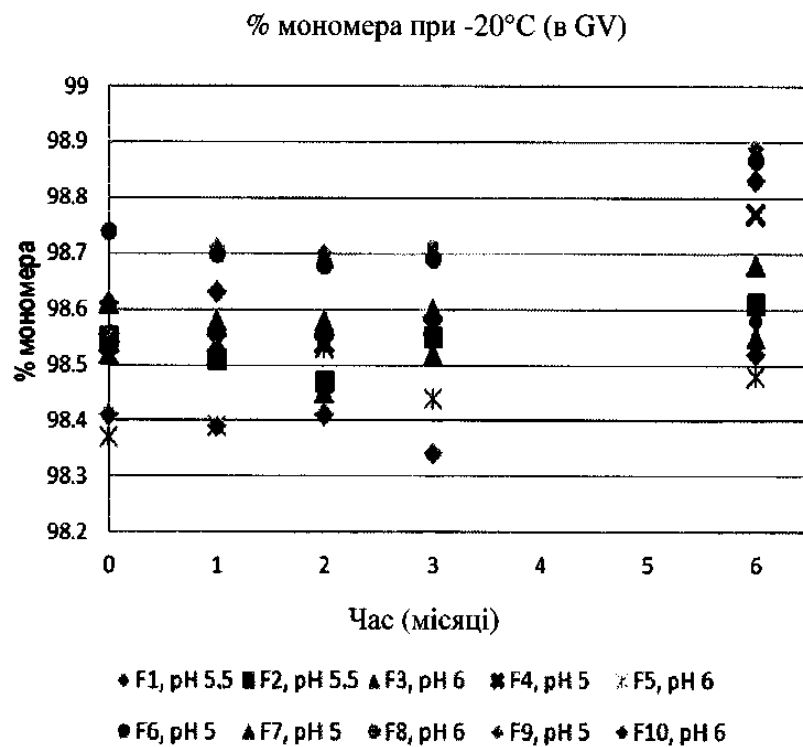
Фіг. 3А



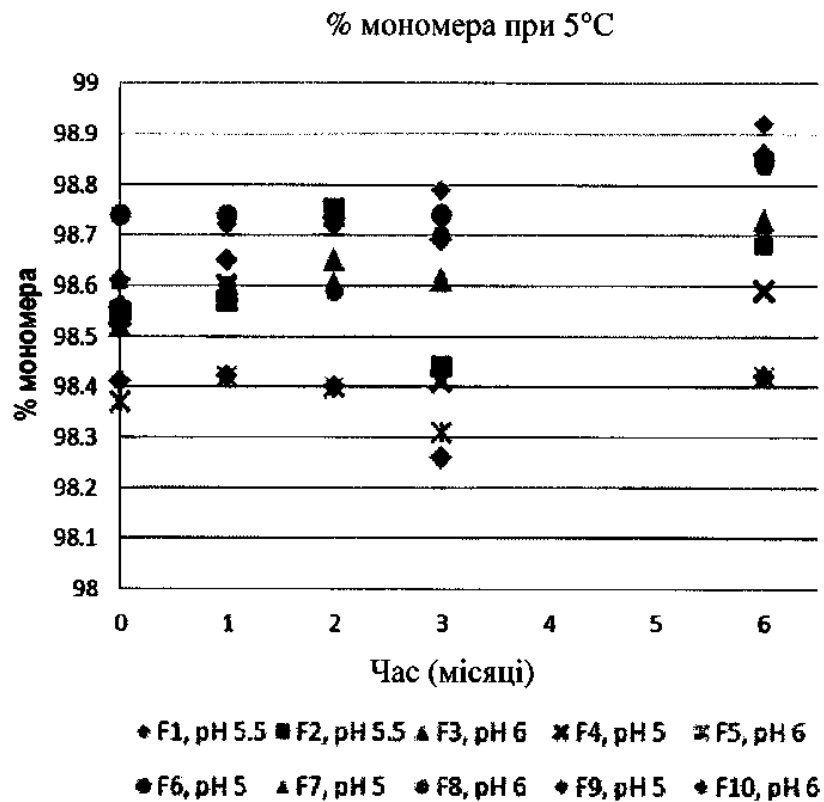
Фіг. 3В



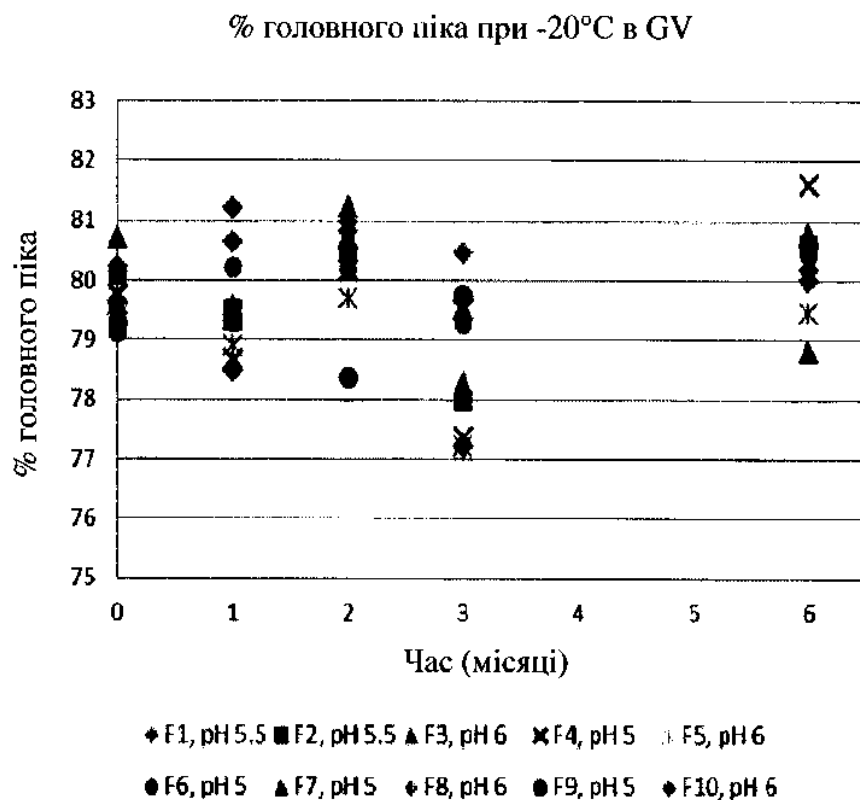
Фіг. 5



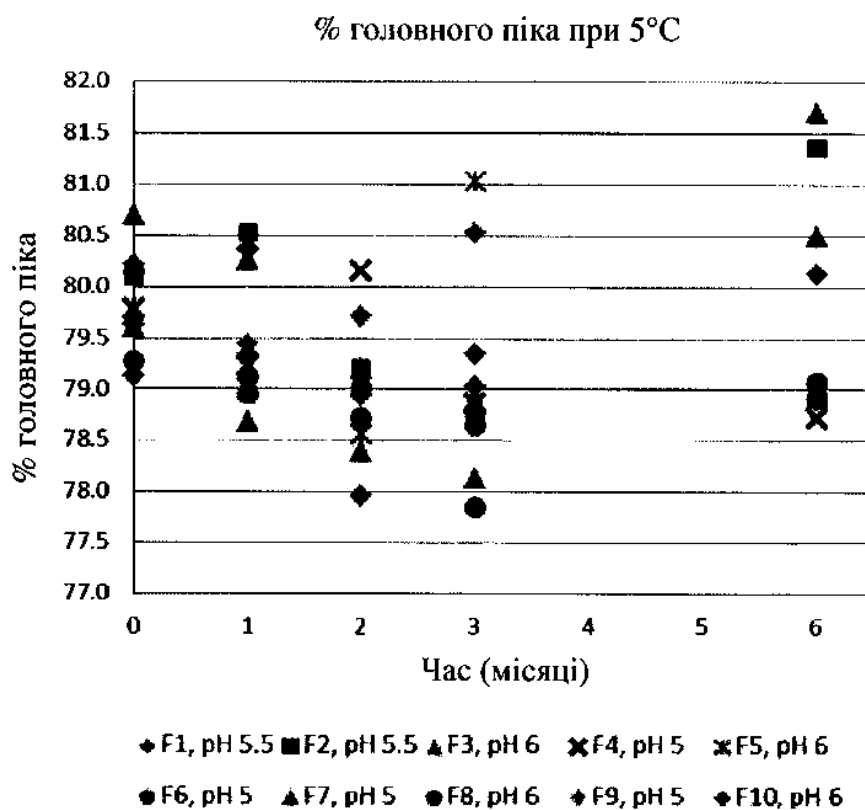
Фіг. 6А



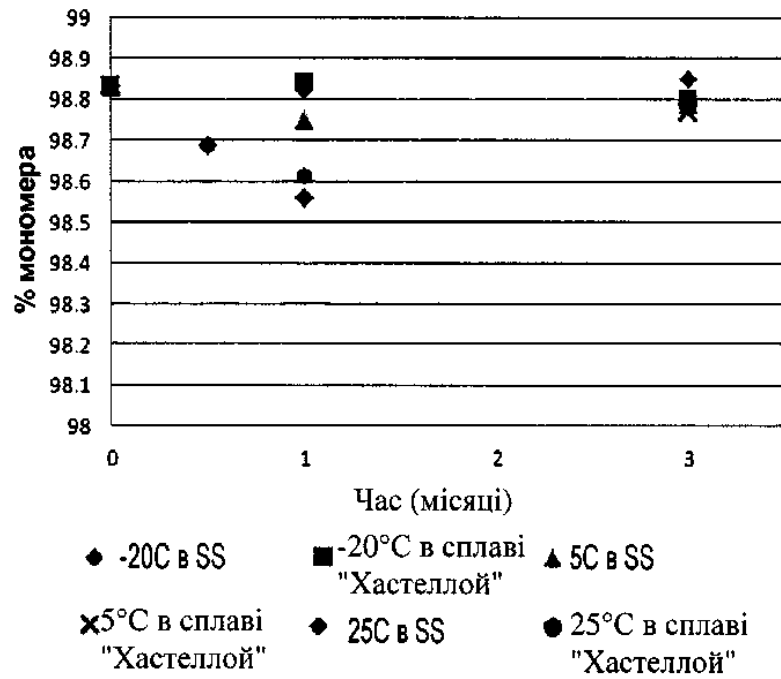
Фіг. 6В



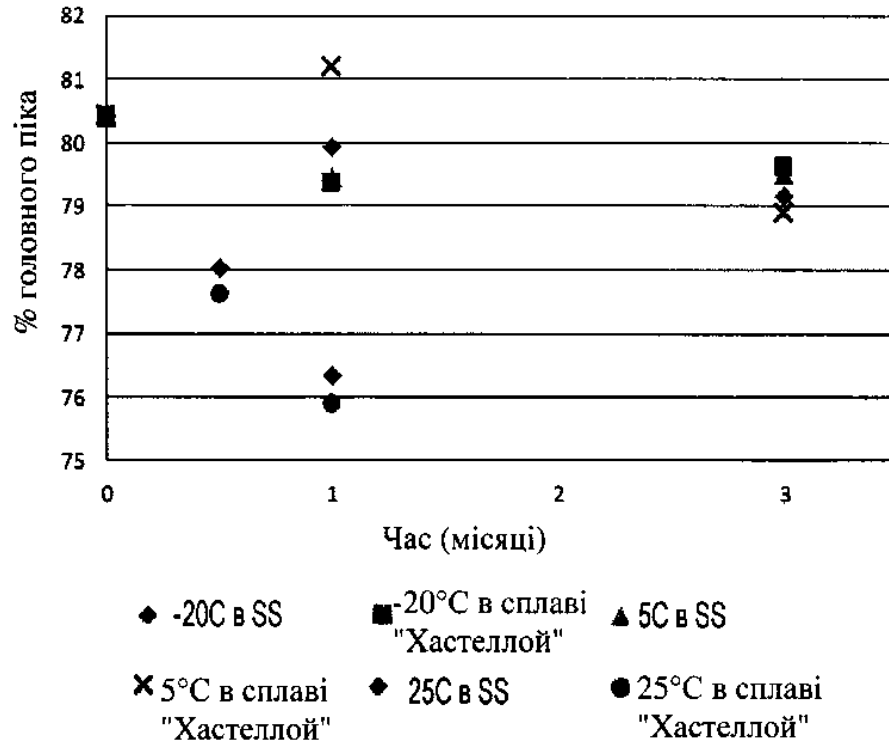
Фіг. 6C



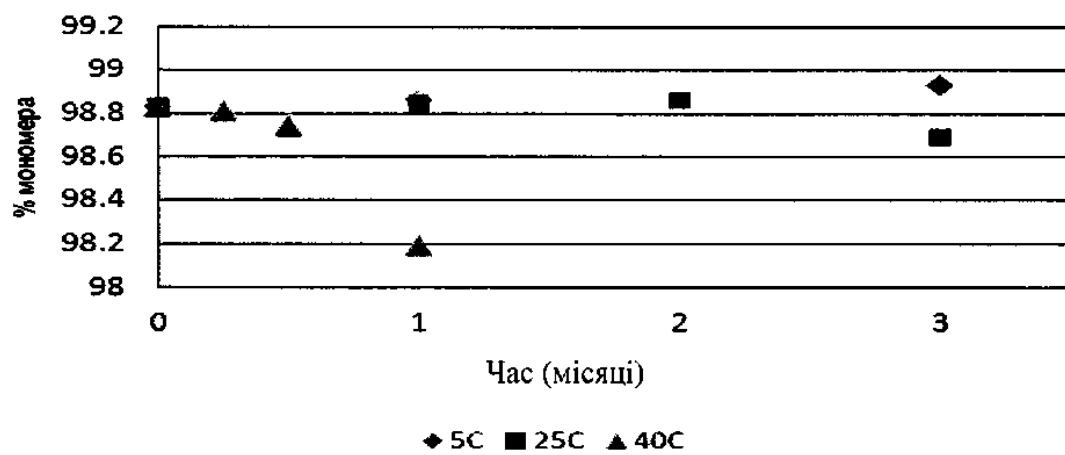
Фіг. 6D



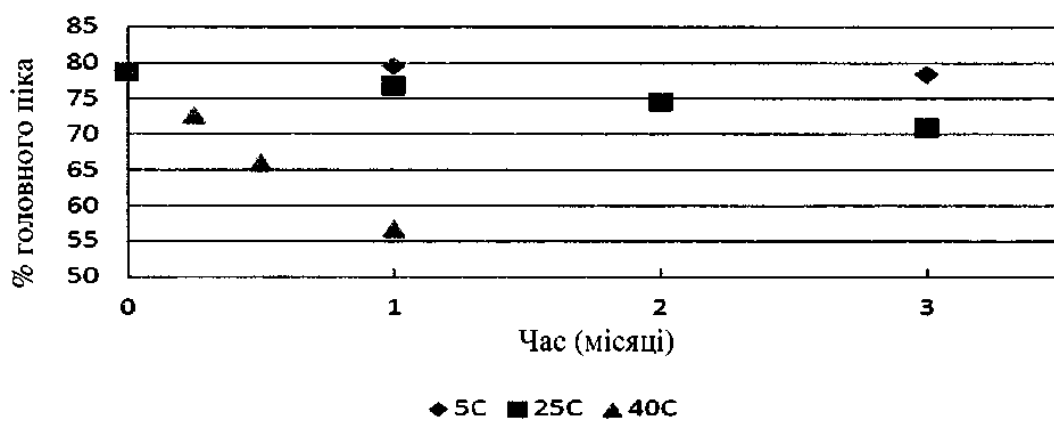
Фіг. 7А



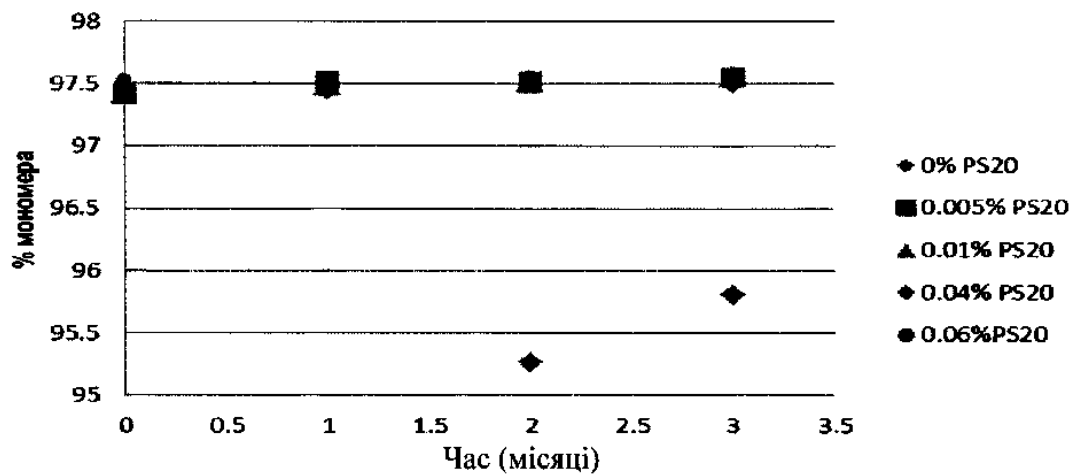
Фіг. 7В



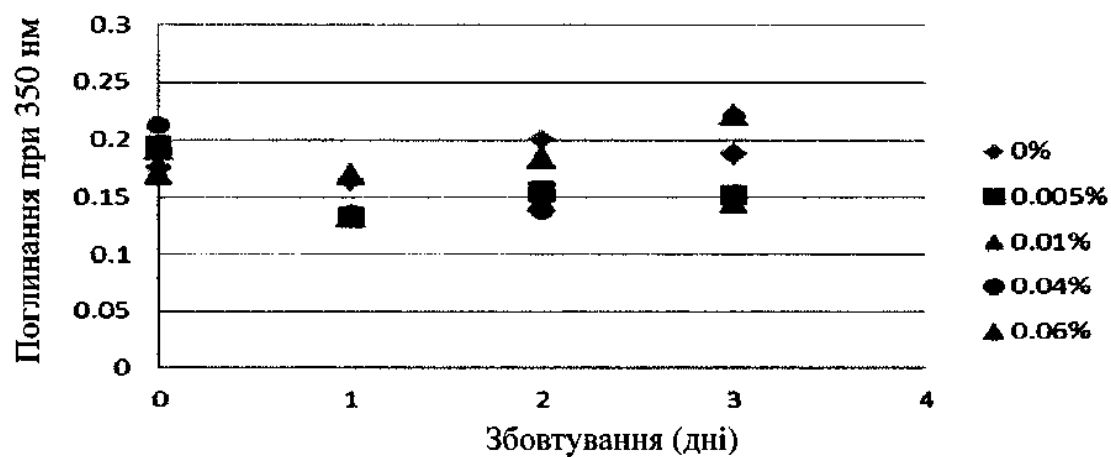
Фіг. 8А



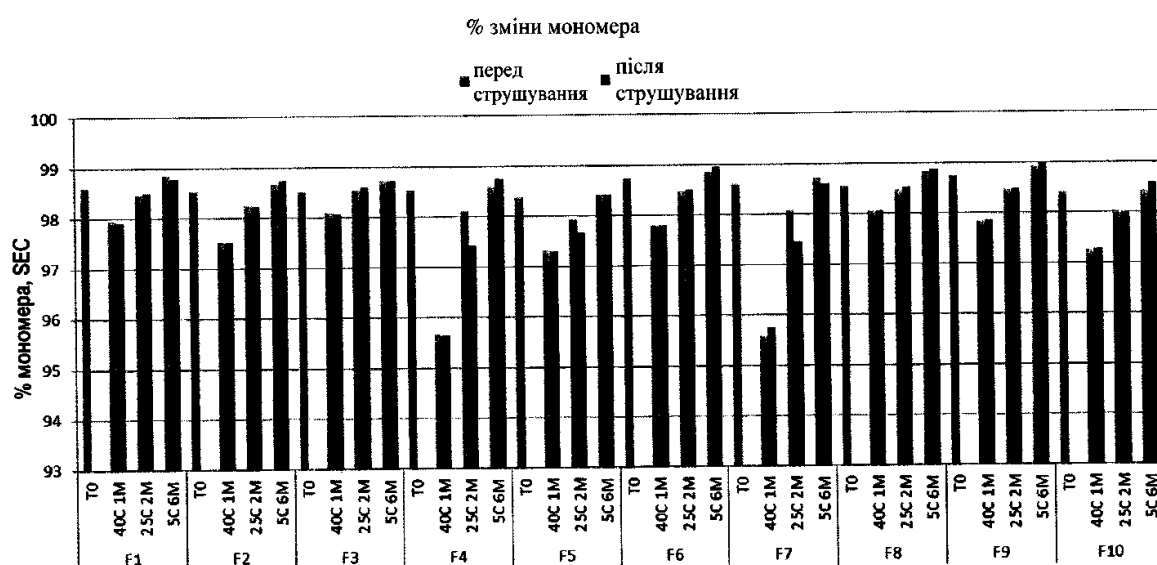
Фіг. 8В



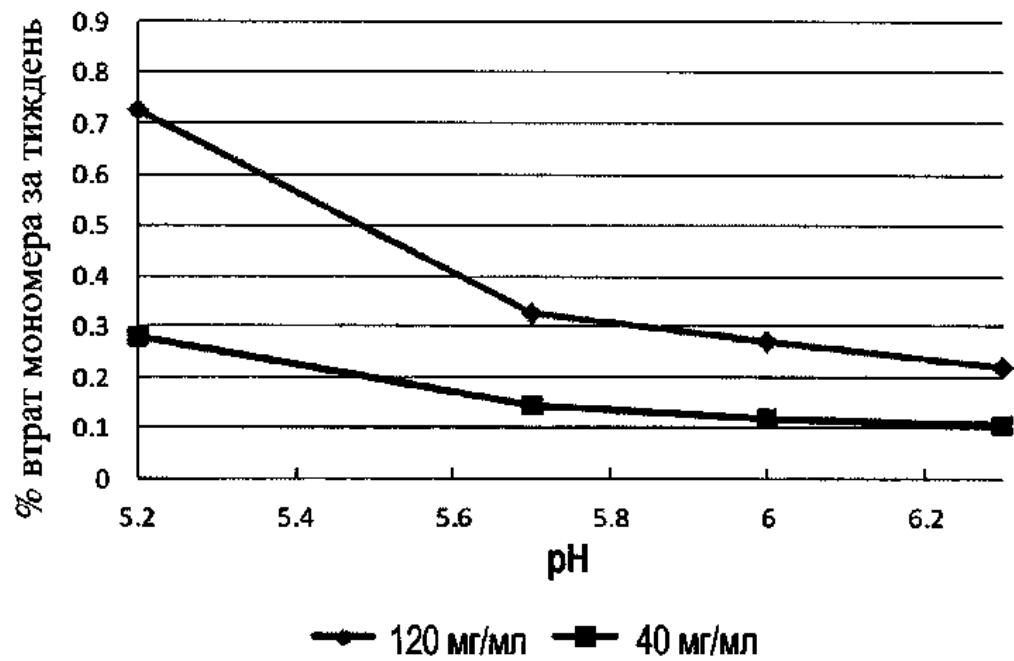
Фіг. 9А



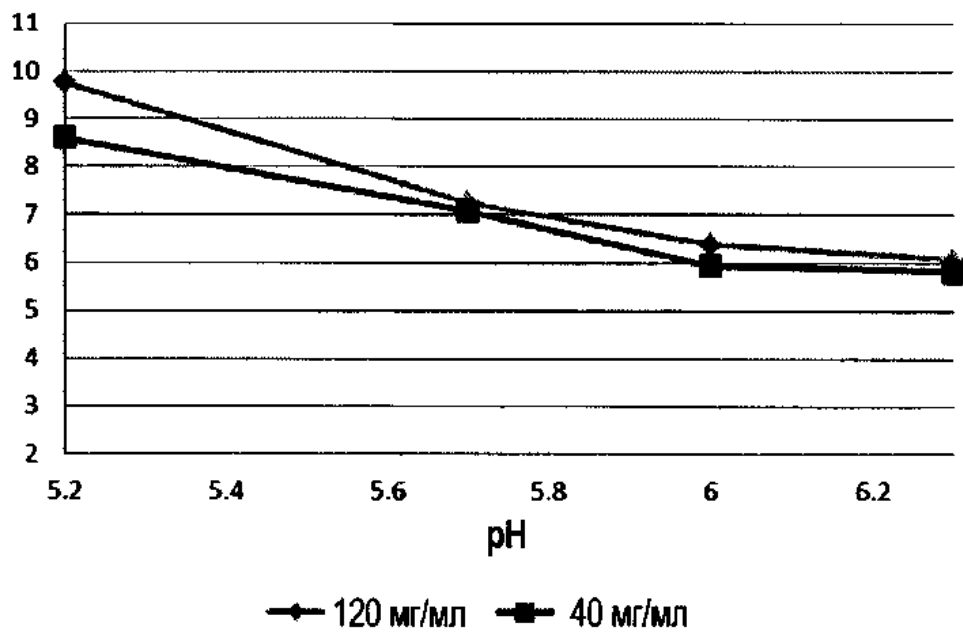
Фіг. 9В



Фіг. 10



Фіг. 11А



Фіг. 11В