

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201890468** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2018.07.31

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

(22) Дата подачи заявки
2016.08.11

(54) **НОВЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ БЕЛКА PD-1**

(31) **PCT/CN2015/086594; PCT/
CN2016/071374**

(32) **2015.08.11; 2016.01.19**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2016/094624**

(87) **WO 2017/025051 2017.02.16**

(71) Заявитель:

**УСИ БАЙОЛОДЖИКС (КАЙМАН)
ИНК. (КУ); ОУПН МОНОКЛОНАЛ
ТЕКНОЛОДЖИ, ИНК. (US)**

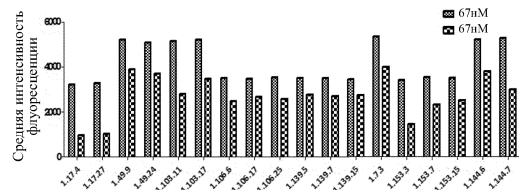
(72) Изобретатель:

**Чжэн Юн (CN), Ли Цзин (US), Чэнь
Чжишэн (CN)**

(74) Представитель:

Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б. (RU)

(57) Данным изобретением предлагаются моноклональные антитела против белка запрограммированной смерти клеток 1 (PD-1), которые могут блокировать связывание PD-1 с его лигандами и таким образом блокировать подавляющее влияние лигандов PD-1 на Т-лимфоциты, в которых экспрессируется PD-1. Антитела по данному изобретению могут служить весьма мощными агентами для лечения множественного рака у людей путем модулирования иммунных функций.



**201890468
A1**

**201890468
A1**

НОВЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ БЕЛКА PD-1

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится в основном к новым антителам против белка PD-1.

Уровень техники

Все больше данных доклинических и клинических исследований свидетельствуют о том, что наиболее многообещающим подходом в лечении больных раком становится целенаправленное воздействие на контрольные точки иммунного ответа. Один из белков, служащих контрольной точкой иммунного ответа, а именно PD-1 (от англ. programmed cell death 1 – белок запрограммированной клеточной смерти 1) играет важную роль в ограничении активности Т-лимфоцитов, которые обеспечивают в значительной степени механизм иммунологической резистентности, позволяющий опухолевым клеткам ускользать от иммунологического надзора организма. В результате взаимодействия мембранного белка PD-1, экспрессирующегося на активированных Т-лимфоцитах и его лиганда PD-L1, экспрессирующегося на опухолевых клетках, действует механизм отрицательной регуляции иммунного ответа и противоопухолевая активность иммунной системы подавляется. Экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках коррелирует с пониженной выживаемостью больных при раке пищевода, поджелудочной железы и других раковых заболеваниях, что указывает на новую перспективную мишень в иммунотерапии опухолей. Фармацевтические компании уже разработали ряд агентов, мишенями которых является путь PD-1, среди которых компании Bristol-Myers Squibb (BMS), Merck, Roche and GlaxoSmithKline (GSK). Данные, полученные в клинических исследованиях, продемонстрировали свидетельства продолжительной лечебной активности и обнадеживающий профиль безопасности у больных с различными опухолями. Разработанный BMS препарат под названием ниволумаб, направленный на PD-1, уже считается одним из центральных препаратов следующего поколения. На сегодняшний день в шести исследованиях продвинутой стадии такое лечение приводило к сокращению объема опухолей в трех из пяти изученных групп больных раком, в том числе у 18% из 72 пациентов с раком легких, у почти трети из 98 пациентов с меланомой и у 27% из 33 пациентов с раком почки. В фирме Merck разработан Лабролизумаб – моноклональное полностью человеческое антитело изотипа IgG4, обладающее активностью, направленной против PD-1; этому препарату после того, как были опубликованы впечатляющие данные исследований стадии IB по лечению рака кожи, Администрацией по контролю качества медикаментов, пищевых продуктов и косметических средств США (FDA) присвоен статус «прорыв в терапии». По результатам

исследования стадии IB объективный противоопухолевый ответ имел место у 51% из 85 больных раком, и полная ремиссия – у 9%. Разработанный в компании Roche экспериментальный препарат MPDL3280A продемонстрировал способность вызывать сокращение объема опухолей у 29 из 140 (21%) пациентов с опухолями поздних стадий и различных размеров.

Однако существующие сейчас терапевтические методы далеко не все удовлетворительны, так что потребность в новых антителах против PD-1 сохраняется.

Краткое раскрытие изобретения

Данным изобретением предлагаются новые моноклональные антитела против PD-1 (в частности, полностью человеческие антитела), кодирующие их полинуклеотиды и способы применения тех и других.

В одном из аспектов данного изобретения предлагаются изолированные моноклональные антитела или их антиген-связывающие фрагменты, способные специфично связываться с человеческим PD-1 со значением K_d не более 10^{-8} М (например, не более чем $\leq 9 \times 10^{-9}$ М, $\leq 8 \times 10^{-9}$ М, $\leq 7 \times 10^{-9}$ М, $\leq 6 \times 10^{-9}$ М, $\leq 5 \times 10^{-9}$ М, $\leq 4 \times 10^{-9}$ М, $\leq 3 \times 10^{-9}$ М, $\leq 2 \times 10^{-9}$ М или $\leq 10^{-9}$ М) по данным измерений методом поверхностного плазмонного резонанса.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела или их антиген-связывающие фрагменты связываются с обезьяньим PD-1 с EC_{50} не более 100 нМ или не более 10 нМ (например, не более 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ или 1 нМ). В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела или их антиген-связывающие фрагменты не связываются с мышинным PD-1, но связываются с обезьяньим PD-1, причем с аффинностью, сходной с таковой для связывания с человеческим PD-1. В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела или их антиген-связывающие фрагменты значительно подавляют связывание человеческого или обезьяньего PD-1 с его лигандом (например, PD-L1 или PD-L2) с IC_{50} не превышающим 100 нМ (например, не превышающим 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ или 0,1 нМ). В некоторых воплощениях данного изобретения значения EC_{50} или IC_{50} определяют путем сортировки клеток с активированной флуоресценцией (сокращенно FACS).

В некоторых воплощениях данного изобретения у предлагаемых антител или их антиген-связывающих фрагментов значительно ослаблена эффекторная функция. В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела или их антиген-

связывающие фрагменты не обеспечивают ADCC или CDC, или обе этих активности.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела или их антиген-связывающие фрагменты содержат аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи, выбираемые из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 13, 15, 21, 23, 25, 33, 35 и 37.

В одном из аспектов данного изобретения предлагаемые антитела или их антиген-связывающие фрагменты содержат аминокислотные последовательности CDR легкой цепи, выбираемые из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 9, 11, 17, 19, 27, 29, 31, 39, 41, 43 и 65.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела или их антиген-связывающие фрагменты содержат по меньшей мере один, два, три, четыре, пять или шесть участков CDR, выбираемых из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 и 11, или из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 15, 5, 7, 17 и 11, или из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 15, 5, 7, 17 и 19, или из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 15, 5, 7, 17 и 65, или из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 23, 25, 27, 29 и 31, или из группы, состоящей из SEQ ID NO: 33, 35, 37, 39, 41 и 43.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела или их антиген-связывающие фрагменты содержат переменную область тяжелой цепи, выбираемую из группы, состоящей из:

- переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 1, 3 и/или 5;
- переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 13, 15 и/или 5;
- переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 1, 15 и/или 5;
- переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 21, 23 и/или 25; и
- переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 33, 35 и/или 37.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела или их антиген-связывающие фрагменты содержат переменную область легкой цепи, выбираемую из группы, состоящей из:

- переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 7, 9 и/или 11;
- переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 7, 17 и/или 11;
- переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 7, 17 и/или 19;
- переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 27, 29 и/или 31;
- переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 39, 41 и/или 43; и
- переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 7, 17 и/или 65.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела или их антиген-связывающие фрагменты, содержат:

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, 3 и/или 5 и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, 9 и/или 11;

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 13, 15 и/или 5 и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, 17 и/или 11;

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, 15 и/или 5 и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, 17 и/или 19;

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 21, 23 и/или 25 и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 27, 29 и/или 31;

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 33, 35 и/или 37 и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39, 41 и/или 43, или

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, 15 и/или 5 и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, 17 и/или 65.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела или их антиген-связывающие фрагменты, содержат переменную область тяжелой цепи, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57 и SEQ ID NO: 61.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела или их антиген-связывающие фрагменты, содержат переменную область легкой цепи, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 67.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела или их антиген-связывающие фрагменты, содержат

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 45, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 47;

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 49, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 51;

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 53, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 55;

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 57, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 59;

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 61, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 63; или

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 53, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 67.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела включают,

например человеческие антитела 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.103.11-v2 hAb, 1.139.15 hAb и 1.153.7 hAb.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела или их антиген-связывающие фрагменты, конкурируют за один и тот же эпитоп с антителами 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.103.11-v2 hAb, 1.139.15 hAb, или 1.153.7 hAb. В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела или их антиген-связывающие фрагменты, связываются с эпитопом, содержащим по меньшей мере один из следующих аминокислотных остатков PD-1: V64, P83, D85, L128, A129, P130, K131, A132 и Q133.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела или их антиген-связывающие фрагменты, способны блокировать связывание человеческого PD-1 с его лигандом и тем самым обеспечивать по меньшей мере одну из следующих активностей:

- индукция продуцирования IL-2 CD4⁺T-клетками;
- индукция продуцирования IFN γ CD4⁺ T-клетками;
- индукция пролиферации CD4⁺ T-клеток;
- отмена супрессивного действия T_{reg}.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела являются моноклональными антителами, полностью человеческими антителами, гуманизированными антителами, химерными антителами, рекомбинантными антителами, биспецифичными антителами, мечеными антителами, бивалентными антителами или антиидиотипическими антителами. В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела или их антиген-связывающие фрагменты, являются полностью человеческими моноклональными антителами, необязательно продуцируемыми трансгенными крысами, например трансгенными крысами, у которых отсутствует эндогенная экспрессия крысиных иммуноглобулинов, но имеются локусы человеческих иммуноглобулинов с делецией в локусе J и мутацией в C-каппа.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антиген-связывающие фрагменты, являются камелизированными однодоменными антителами, димерами scFv, BsFv, dsFv, (dsFv)₂, dsFv-dsFv', Fv фрагментами, Fab, Fab' и F(ab')₂, ds димерами, нанотелами, доменными антителами или бивалентными доменными антителами.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела или их антиген-связывающие фрагменты содержат также иммуноглобулиновую константную область.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела или их антиген-связывающие фрагменты содержат также конъюгированный компонент (являются конъюгатами).

В некоторых воплощениях данного изобретения конъюгированный с антителами или их фрагментами компонент является детектируемой меткой; агентом, влияющим на фармакокинетические свойства, или агентом для очистки.

В другом аспекте данного изобретения предлагаются изолированные полинуклеотиды, кодирующие предлагаемые в настоящем документе антитела или их антиген-связывающие фрагменты. В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаются полинуклеотиды, кодирующие аминокислотные последовательности описанных в настоящем документе антител или их антиген-связывающих фрагментов. В некоторых других воплощениях данного изобретения предлагаются векторы, содержащие указанные полинуклеотиды, а в некоторых других воплощениях данного изобретения предлагаются клетки-хозяева, содержащие указанные векторы. В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаются способы, обеспечивающие экспрессию одного или более описанных в настоящем документе антител или их антиген-связывающих фрагментов путем культивирования указанных клеток-хозяев в условиях, в которых указанные полинуклеотиды, кодирующие описанные в настоящем документе антитела или их антиген-связывающие фрагменты, экспрессируются с вектора. В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые в настоящем документе полинуклеотиды функционально связаны с промотором, например с промотором SV40, входящим в состав вектора. В некоторых воплощениях данного изобретения клетки-хозяева, несущие предлагаемые в настоящем описании векторы, являются клетками яичника китайского хомячка или клетками 293F.

В другом аспекте данного изобретения предлагаются наборы, содержащие антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

В одном из аспектов данного изобретения предлагаемые в настоящем документе антитела против PD-1, например 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.103.11-v2 hAb, 1.139.15 hAb и 1.153.7 hAb, отличаются хорошей переносимостью и высокой противоопухолевой активностью *in vivo* у животных. В некоторых воплощениях данного изобретения у животных с опухолевыми клетками, которым вводили антитела против PD-1, предлагаемые в настоящем документе, объем опухолей уменьшался на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% по сравнению с контрольными особями, у которых был

исходно близкий объем опухолей, но вводили им только несущую среду без антител.

В другом аспекте данного изобретения предлагаются способы лечения состояний у индивида, связанных с PD-1, включающие введение в организм этого индивида терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе антитела или его антиген-связывающего фрагмента. В некоторых воплощениях данного изобретения указанный индивид страдает расстройством или состоянием, на которое вероятно должен влиять антагонист PD-1. В некоторых воплощениях данного изобретения в образце биологического материала, взятого у указанного индивида, установлено присутствие или повышенный уровень PD-L1.

В другом аспекте данного изобретения предлагаются фармацевтические композиции, содержащие описанное в настоящем документе антитело или его антиген-связывающий фрагмент, и один или более фармацевтически приемлемых носителей. В некоторых из воплощений этого аспекта данного изобретения фармацевтическими носителями могут быть, например, разбавители, антиоксиданты, адъюванты и другие эксципиенты или нетоксичные дополнительные агенты.

В другом аспекте данного изобретения предлагаются способы лечения состояний, при которых для индивида благотворно усиление иммунного ответа; эти способы включают введение указанному индивиду эффективного количества описанного в настоящем документе антитела или его антиген-связывающего фрагмента. В некоторых воплощениях данного изобретения у указанного индивида повышен уровень экспрессии PD-L1 или у него выявлена экспрессия PD-L1.

Предлагается применение описанных в настоящем документе антител или их антиген-связывающих фрагментов с целью изготовления лекарственных средств для лечения состояния, при котором благотворно усиление иммунного ответа. В некоторых воплощениях данного изобретения это состояние является раковым заболеванием или хронической вирусной инфекцией.

Краткое описание фигур

Фигура 1 иллюстрирует связывание полностью человеческих антител против PD-1 с клетками CHO, в которых экспрессируется PD-1, по данным FACS анализа.

Фигура 2 иллюстрирует связывание полностью человеческих антител против PD-1 с клетками CHO, в которых экспрессируется PD-1, с EC₅₀ около 2 нМ по данным FACS анализа.

Фигура 3 иллюстрирует связывание полностью человеческих антител против PD-1 с активированными CD4⁺T-лимфоцитами, в которых экспрессируется PD-1, по данным FACS анализа.

Фигура 4 иллюстрирует способность полностью человеческих антител против PD-1 блокировать связывание PD-L1 с клетками CHO, трансфицированными PD-1, с IC_{50} около 3-8 нМ по данным FACS анализа.

Фигура 5 иллюстрирует, что полностью человеческие антитела против PD-1 специфично связываются с PD-1, но не связываются с другими членами того же семейства - CD28 и CTLA4; по данным FACS анализа.

Фигура 6 иллюстрирует, что полностью человеческие антитела против PD-1 связываются с PD-1 яванского макака, но не связываются с мышинным PD-1.

Фигура 7 представляет кинетические показатели, характеризующие аффинность связывания антител против PD-1 с человеческим PD-1 в диапазоне от $3,76E-9$ до $1,76E-10$ моль/л по данным метода поверхностного плазмонного резонанса.

Фигура 8 иллюстрирует влияние полностью человеческих антител против PD-1 на продукцию IL-2 в реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR).

Фигура 9 иллюстрирует влияние полностью человеческих антител против PD-1 на продукцию IFN γ в реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR).

Фигура 10 демонстрирует, что полностью человеческие антитела против PD-1 способствуют пролиферации Т-лимфоцитов в реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR).

Фигура 11 демонстрирует, что полностью человеческие антитела против PD-1 способствуют пролиферации Т-лимфоцитов при специфичном Т-клеточном иммунном ответе.

Фигура 12 демонстрирует, что антитела против PD-1 обращают вспять супрессивную функцию регуляторных Т-лимфоцитов (T $_{reg}$).

Фигура 13 демонстрирует, что антитела против PD-1 не вызывают ADCC в отношении активированных Т-лимфоцитов.

Фигура 14 демонстрирует, что антитела против PD-1 не вызывают CDC в отношении активированных Т-лимфоцитов.

Фигура 15 демонстрирует, что антитела 1.103.11-v2 hAb, связываясь с внеклеточным доменом человеческого белка PD-1, в различных буферных растворах проявляют сходную аффинность (по данным ELISA). Обозначение «1.103.11-v2 hAb в буферном растворе» относится к разведению антител буферным раствором для приготовления фармацевтической композиции, а обозначение «1.103.11-v2 hAb в PBS» относится к разведению антител буферным раствором 1xPBS (pH 7,4).

Фигура 16 демонстрирует, что антитела 1.103.11-v2 hAb, связываясь с клетками CHO, в которых экспрессируется белок PD-1, в различных буферных растворах

проявляют сходную аффинность (по данным FACS). Обозначение «1.103.11-v2 hAb в буферном растворе» относится к разведению антител буферным раствором для приготовления фармацевтической композиции, а обозначение «1.103.11-v2 hAb в PBS» относится к разведению антител буферным раствором 1xPBS (pH 7,4).

Фигура 17 изображает расположение «горячих» аминокислотных остатков (темные) в кристаллической структуре человеческого PD-1, с которыми связываются антитела. На фиг. 17A показаны общие «горячие точки», на фиг. B-D «горячие точки» для 1.103.11 hAb, кейтруды и 11.148.10 hAb, соответственно.

Осуществление изобретения

Нижеследующее описание данного изобретения имеет своей целью только иллюстрировать различные его воплощения. Те конкретные модификации, которые здесь обсуждаются, не следует считать ограничивающими объем изобретения. Для специалистов в данной области техники ясно, что возможны различные эквиваленты, изменения и модификации изобретения без отклонения от него объема; также понятно, что такие эквивалентные воплощения включаются в настоящее описание. Все приводимые в настоящем документе ссылки, в том числе публикации, патенты и патентные заявки, полностью включаются в настоящий документ путем отсылки.

Определения

Термин «антитело» в настоящем документе включает любой иммуноглобулин, моноклональное антитело, поликлональное антитело, полиспецифичное антитело, биспецифичное (бивалентное) антитело, связывающиеся с определенным антигеном. Нативное интактное антитело состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей. Каждая тяжелая цепь – состоит из переменной области и первого, второго и третьего домена константной области, в то время как каждая легкая цепь содержит переменную область и один домен константной области. У млекопитающих тяжелые цепи антител разделяют на пять типов - α , δ , ϵ , γ и μ , а легкие цепи представлены двумя типами - λ или κ . Молекула антитела имеет форму буквы Y: ее «ножка» образована вторыми и третьими доменами двух тяжелых цепей, соединенных дисульфидной связью. Каждое из плеч буквы Y образована переменной областью и первым константным доменом одной тяжелой цепи связанными с переменной и константной областями легкой цепи. Переменные области тяжелых и легких цепей обеспечивают связывание с антигеном. В переменных областях обеих цепей обычно имеются три высоко переменных петлеобразных участка, называемых гиперпеременными или участками, определяющими комплементарность (CDR); легкая (L) цепь включает участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3, тяжелая (H) цепь - HCDR1, HCDR2, HCDR3. Границы участков CDR в описанных в настоящем документе

антителах и их фрагментах, связывающих антиген, определяют или идентифицируют по правилам Кабата, Хотиа или Аль-Ладзикани (Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997); Chothia, C. et al., J. Mol. Biol. Dec. 5;186(3):651-63 (1985); Chothia, C., Lesk, A.M., J. Mol. Biol., 196,901 (1987); Chothia, C. et al., Nature. Dec 21-28;342(6252):877-83 (1989) ; Kabat E.A. et al., National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Эти три участка CDR чередуются с участками, называемыми каркасными (FR), которые значительно более консервативны, нежели участки CDR; каркасные участки служат структурной опорой для гипервариабельных петель. Константные области тяжелых и легких цепей не участвуют в связывании с антигеном, но выполняют различные эффекторные функции. Антитела подразделяют на классы в зависимости от аминокислотной последовательности тяжелых цепей. Основные пять классов антител обозначаются IgA, IgD, IgE, IgG и IgM; они различаются наличием тяжелых цепей типов α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Некоторые основные классы антител подразделяют на подклассы, например IgG1 (тяжелые цепи $\gamma 1$), IgG2 (тяжелые цепи $\gamma 2$), IgG3 (тяжелые цепи $\gamma 3$), IgG4 (тяжелые цепи $\gamma 4$), IgA1 (тяжелые цепи $\alpha 1$) или IgA2 (тяжелые цепи $\alpha 2$).

Термин «антиген-связывающий фрагмент» в настоящем документе относится фрагментам антитела, образуемым частью молекулы антитела, содержащей один или более участков CDR, или к любому другому фрагменту антитела, связывающему антиген, но не содержащему интактных структур нативного антитела. Примеры антиген-связывающих фрагментов включают (не ограничиваясь перечисленным здесь) дитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, стабилизированный дисульфидной связью фрагмент Fv (dsFv) и его димер (dsFv)₂, биспецифичный dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидной связью дитело (ds-дитело), одноцепочечные антительные молекулы (scFv) и димер scFv (двухвалентное антитело), полиспецифичное антитело, камелизированное однодоменное антитело, нанотело, однодоменное антитело, бивалентное однодоменное антитело. Антиген-связывающий фрагмент, способен к связыванию с тем же антигеном, что и исходное антитело. В некоторых воплощениях данного изобретения антиген-связывающий фрагмент, содержит один или более участков CDR из определенного человеческого антитела, которые трансплантированы к каркасным участкам из одного или более других человеческих антител.

Обозначение “Fab” применительно к антителам относится к части антитела, состоящей из одной легкой цепи (включая и вариабельную, и константную области), присоединенной дисульфидной связью к вариабельной области и первому константному домену одной тяжелой цепи.

Обозначение “Fab” относится к фрагменту Fab, включающему часть шарнирного

участка.

Обозначение “F(ab')₂” относится к димеру Fab’.

Обозначение “Fc” применительно к антителам относится к части антитела, состоящей из второго и третьего константных доменов первой тяжелой цепи, присоединенной дисульфидными связями ко второму и третьему константным доменам второй тяжелой цепи. Часть молекулы антитела, обозначаемая Fc, обеспечивает различные эффекторные функции, например ADCC и CDC но в связывании с антигеном роли не играет.

Обозначение “Fv” применительно к антителам относится к наименьшему фрагменту антитела, которая может содержать весь антигенсвязывающий центр. Фрагмент Fv состоит из переменной области одной легкой цепи связанной с переменной областью одной тяжелой цепи.

Термин «одноцепочечное Fv-антитело» (обозначается “scFv”) относится к сконструированному антителу, состоящему из переменной области легкой цепи и переменной области тяжелой цепи, соединенных в единую полипептидную цепь непосредственно или посредством пептидного линкера (Huston J.S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879(1988)).

Термин «одноцепочечное Fv-Fc-антитело» (обозначается “scFv-Fc”) относится к сконструированному антителу, состоящему из молекулы scFv, соединенной с областью Fc.

Термин «камелизированное однодоменное антитело», «тяжелоцепочечное антитело» или “HCAb” относится антителу, содержащему два V_H домена и не содержащему легких цепей (Riechmann L., Muyldermans S., J. Immunol. Methods. Dec. 10;231(1-2):25-38 (1999); Muyldermans S., J. Biotechnol. Jun.;74(4):277-302 (2001); WO94/04678; WO94/25591; патент США № 6,005,079). Тяжелоцепочечные антитела были исходно получены от представителей Camelidae (двугорбые верблюды, одногорбые верблюды и ламы) Хотя камелизированные антитела не имеют легких цепей, они обладают полноценным антигенным репертуаром (Hamers-Casterman C. et al., Nature. Jun 3;363(6428):446-8 (1993); Nguyen V.K. et al. “Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation,” Immunogenetics. Apr;54(1):39-47 (2002); Nguyen V.K. et al. Immunology. May;109(1):93-101 (2003)). Переменная область тяжелоцепочечных антител (V_HH) является наименьшей известной антигенсвязывающей молекулой, образующейся посредством приобретенного иммунного ответа (Koch-Nolte F. et al., FASEB J. Nov;21(13):3490-8. Epub. 2007 Jun 15 (2007)).

Термин «нанотело» относится к антительной молекуле, состоящей из домена V_HH

из тяжелоцепочечного антитела и двух константных доменов - CH2 и CH3.

Так называемые «дитела» включают небольшие фрагменты антител с двумя сайтами связывания антигена; эти фрагменты содержат домен V_H , соединенный доменом V_L в единую полипептидную цепь (V_H - V_L или V_L - V_H) (см., например, Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Jul 15; 90(14):6444-8 (1993); Европейский патент № 404097; WO93/11161). При использовании линкера, слишком короткого для того, чтобы могли соединиться два домена одной цепи, домены вынуждены образовывать пару с соответствующим доменом иной цепи, так что получаются два антигенсвязывающих участка. Эти два участка могут связываться с одним и тем же антигеном (или эпитопом) или же с разными.

Термин «доменное антитело» относится к фрагменту антитела, содержащему только переменную область тяжелой цепи (V_H) или переменную область легкой цепи (V_L). В некоторых случаях два или более домена V_H соединены ковалентно пептидным линкером, образуя двухвалентное(бивалентное) или поливалентное однодоменное антитело. Два домена V_H двухвалентного однодоменного антитела могут связываться с одним и тем же или с разными антигенами.

В некоторых воплощениях данного изобретения молекула «(dsFv)₂» содержит три полипептидных цепи: две цепи V_H , соединенные пептидным линкером, связаны дисульфидными мостиками с двумя цепями V_L .

В некоторых воплощениях данного изобретения молекула биспецифичного ds дителасодержит цепи V_{H1} - V_{L2} (соединенные пептидным линкером), связанные с цепями V_{L1} - V_{H2} (также соединенными пептидным линкером) посредством дисульфидного мостика между V_{H1} и V_{L1} .

В некоторых воплощениях данного изобретения «биспецифическое dsFv» или «dsFv-dsFv'» содержит три полипептидные цепи: структуру V_{H1} - V_{H2} , в которой тяжелые цепи соединены пептидным линкером (например, длинным гибким линкером) и дисульфидными мостиками связаны с структурами V_{L1} и V_{L2} , причем каждая удерживаемая дисульфидным мостиком пара легкая цепь-тяжелая цепь обладает своей антигенной специфичностью.

В некоторых воплощениях данного изобретения «димер scFv» является двухвалентным дителом или двухвалентной молекулой ScFv (BsFv), содержащими структуру V_H - V_L (соединенные пептидным линкером), которая образует димер с другой структурой V_H - V_L , так что V_H' одной структуры совместно с V_L' другой такой структуры образует два связывающих центра, направленных на один и тот же антиген (или эпитоп) или же к разным антигенам (или эпитопам). В других воплощениях данного изобретения

димер scFv является биспецифичным димером, содержащим структуру $V_{H1}-V_{L2}$ (соединенную пептидным линкером), которая связана со структурой $V_{L1}-V_{H2}$ (также соединенную пептидным линкером), так что V_{H1} совместно с V_{L1} и V_{H2} совместно с V_{L2} образуют два связывающих центра с разной антигенной специфичностью.

Формулировка «полностью человеческий» в настоящем документе применительно к антителам или антиген-связывающим фрагментам, означает, что данное антитело или антиген-связывающий фрагмент имеет или состоит из аминокислотной(ых) последовательности(ей), соответствующей(их) таковым антитела, образовавшегося в человеческом организме или в человеческой клетке иммунной системы, или происходит из не человеческого источника, например произведено трансгенным животным, которое не является человеком, в организме которого задействован репертуар человеческих антител или иные кодирующие человеческое антитело последовательности. В некоторых воплощениях данного изобретения полностью человеческое антитело не содержит аминокислотных остатков (в частности, участвующих в связывании антигена), происходящих из не человеческих антител.

Термин «гуманизированный» в настоящем документе применительно к антителам или антиген-связывающим фрагментам означает, что данное антитело или антиген-связывающий фрагмент, содержит участки CDR, происходящие из не человеческих источников, каркасные участки (FR) человеческого происхождения и при необходимости константные области человеческого происхождения. В некоторых воплощениях данного изобретения гуманизированные антитела или антиген-связывающие фрагменты, можно использовать в качестве терапевтических средств для людей, поскольку их иммуногенность для человека понижена. В некоторых воплощениях данного изобретения источник не человеческого происхождения (животное) является млекопитающим, например мышью, крысой, кроликом, козой, овцой, морской свинкой или хомяком. В некоторых воплощениях данного изобретения гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент, образованы в основном полностью человеческими аминокислотными последовательностями за исключением участков CDR, которые происходят из не человеческого источника. В некоторых воплощениях данного изобретения каркасные участки (FR) человеческого происхождения могут содержать такие же аминокислотные последовательности, что и человеческое антитело, из которого они происходят, или же эти участки могут содержать аминокислотные замены, например не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замен аминокислот. В некоторых воплощениях данного изобретения подобные замены аминокислотных остатков имеются в каркасных участках только тяжелых цепей, в каркасных участках только легких цепей или же в

каркасных участках и тяжелых, и легких цепей. В некоторых предпочтительных воплощениях данного изобретения гуманизированные антитела содержат человеческие последовательности FR1-3, JH и Jk.

Термин «химерный» в настоящем документе означает, что в данном антителе или антиген-связывающем фрагменте имеется часть тяжелой и/или легкой цепи, происходящей из организма какого-то одного вида, а остальная часть тяжелой и/или легкой цепи происходит из организмов других видов. В иллюстративном примере химерное антитело содержит константную область человеческого происхождения и переменную область не человеческого происхождения, например мышиную.

Обозначение “PD-1” в настоящем документе относится к белку программируемой клеточной смерти, который относится к надсемейству иммуноглобулинов; этот белок действует как коингибирующий рецептор в отрицательной регуляции иммунной системы. PD-1 принадлежит к семейству белков CD28/CTLA-4; известны два его лиганда - PD-L1 и PD-L2. Репрезентативная аминокислотная последовательность человеческого PD-1 представлена в базе данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) с идентификатором NP_005009.2; а репрезентативная нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий PD-1 представлена в базе данных NCBI с идентификатором NM_005018.2.

Обозначение “PD-L1” в настоящем документе относится к лиганду 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1) (см., например, Freeman G.J. et al. (2000) *J. Exp. Med.* 192:1027). Репрезентативная аминокислотная последовательность человеческого PD-L1 представлена в базе данных NCBI с идентификатором NP_054862.1, а репрезентативная нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий PD-L1 представлена в базе данных NCBI с идентификатором NM_014143.3. PD-L1 экспрессируется в плаценте, селезенке, лимфатических узлах, тимусе, сердце, печени плода, а также присутствует на многих опухолевых или раковых клетках. PD-L1 связывается с двумя рецепторами - PD-1 и B7-1 (CD80), которые экспрессируются на активированных Т-лимфоцитах, на В-лимфоцитах и на миелоидных клетках. Связывание PD-L1 с его рецептором вызывает передачу сигнала, приводящего к подавлению TCR-опосредованной активации продукции цитокинов и пролиферации Т-клеток. Соответственно PD-L1 играет важнейшую роль в подавлении иммунной системы в таких процессах и состояниях, как беременность, аутоиммунные заболевания, отторжение трансплантата, и считается, что этот белок позволяет опухолевым или раковым клеткам ускользать от иммунологического надзора и избегать иммунного ответа.

Термин «антитело против PD-1» в настоящем документе относится к антителу,

способному к специфичному связыванию с PD-1 (например, с человеческим или с обезьяньим PD-1), аффинность которого достаточна для обеспечения диагностического и/или терапевтического применения.

Термин «специфичное связывание» и его производные (например, формулировка «специфично связывается») в настоящем документе относится к не случайной реакции связывания между двумя молекулами, например между антителом и антигеном. В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые в настоящем документе антитела или антиген-связывающие фрагменты, специфично связываются с человеческим или обезьяньим PD-1, с аффинностью связывания (K_D) $\leq 10^{-6}$ М (например, $\leq 5 \times 10^{-7}$ М, $\leq 2 \times 10^{-7}$ М, $\leq 10^{-7}$ М, $\leq 5 \times 10^{-8}$ М, $\leq 2 \times 10^{-8}$ М, $\leq 10^{-8}$ М, $\leq 5 \times 10^{-9}$ М, $\leq 2 \times 10^{-9}$ М, $\leq 10^{-9}$ М, 10^{-10} М). Термин « K_D » в настоящем документе относится к отношению скорости диссоциации к скорости ассоциации (k_{off}/k_{on}); этот показатель определяют, например, с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, например используя систему *Viacore*.

Формулировка «способность блокировать связывание» или «способность конкурировать за один и тот же эпитоп» в настоящем документе относится к способности антитела или антиген-связывающего фрагмента ингибировать взаимодействие между двумя молекулами (например, между человеческим PD-1 и антителом против PD-1) в детектируемой степени. В некоторых воплощениях данного изобретения антитело или антиген-связывающий фрагмент, блокирующие связывание двух молекул, ингибируют взаимодействие между ними на по меньшей мере на 50%. В некоторых воплощениях данного изобретения указанное ингибирование превышает 60%, 70%, 80% или 90%.

Термин «эпитоп» в настоящем документе относится к определенной группе атомов или аминокислотных остатков антигена, с которой связывается антитело. Два антитела могут связываться с одним и тем же эпитопом антигена, если они проявляют конкурентное связывание с данным антигеном. Например, если описанное в настоящем документе антитело или антиген-связывающий фрагмент, блокируют связывание какого-либо из антител, описанных в примерах настоящего документа, например 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.103.11-v2 hAb, 1.139.15 hAb и 1.153.7 hAb, с человеческим PD-1, то можно считать, что данное антитело или антиген-связывающий фрагмент, связываются с тем же эпитопом, что и антитело из примеров.

В эпитопе можно осуществлять мутации, заменяя тот или иной аминокислотный остаток (например, проводить сканирующий аланином мутагенез) и таким путем идентифицировать мутации, вызывающие ослабление связывания или предотвращающие его. Метод мутагенеза со сканированием аланином применяют для идентификации аминокислотных остатков или областей белковой молекулы, влияющих на

взаимодействие эпитопа со связывающимся с ним другим белком или иным веществом. Аминокислотный остаток или группа остатков-мишеней в пределах белка заменяется на нейтральные или отрицательно заряженные остатки (наиболее предпочтительно на аланин или полиаланин, или осуществляют консервативные аминокислотные замены). Всякая мутация, то есть замена аминокислотного остатка или кодирующего его кодона, которая приводит к ослаблению связывания данного белка ниже некоторой пороговой величины или же уменьшающее это связывание максимально по сравнению с другими мутациями, с большой долей вероятности затрагивает эпитоп. В некоторых воплощениях данного изобретения эпитоп, критичный для антител против PD-1, содержит по меньшей мере один из следующих аминокислотных остатков: V64, P83, D85, L128, A129, P130, K131, A132 и Q133.

Обозначение “1.7.3 hAb” в настоящем документе относится к полностью человеческому моноклональному антителу, переменная область тяжелой цепи которого представлена последовательностью SEQ ID NO: 45, переменная область легкой цепи - последовательностью SEQ ID NO: 47, и человеческая константная область относится к изотипу IgG4.

Обозначение “1.49.9 hAb” в настоящем документе относится к полностью человеческому моноклональному антителу, переменная область тяжелой цепи которого представлена последовательностью SEQ ID NO: 49, переменная область легкой цепи - последовательностью SEQ ID NO: 51, и человеческая константная область относится к изотипу IgG4.

Обозначение “1.103.11 hAb” в настоящем документе относится к полностью человеческому моноклональному антителу, переменная область тяжелой цепи которого представлена последовательностью SEQ ID NO: 53, переменная область легкой цепи - последовательностью SEQ ID NO: 55, и человеческая константная область относится к изотипу IgG4.

Обозначение “1.103.11-v2 hAb” в настоящем документе относится к полностью человеческому моноклональному антителу, переменная область тяжелой цепи которого представлена последовательностью SEQ ID NO: 53, переменная область легкой цепи - последовательностью SEQ ID NO: 67, и человеческая константная область относится к изотипу IgG4.

Обозначение “1.139.15 hAb” в настоящем документе относится к полностью человеческому моноклональному антителу, переменная область тяжелой цепи которого представлена последовательностью SEQ ID NO: 57, переменная область легкой цепи - последовательностью SEQ ID NO: 59, и человеческая константная область относится к

изотипу IgG4.

Обозначение “1.153.7 hAb” в настоящем документе относится к полностью человеческому моноклональному антителу, вариабельная область тяжелой цепи которого представлена последовательностью SEQ ID NO: 61, вариабельная область легкой цепи - последовательностью SEQ ID NO: 63, и человеческая константная область относится к изотипу IgG4.

Термин «консервативная замена» применительно к аминокислотной последовательности относится к замене аминокислотного остатка на остаток другой аминокислоты, имеющей боковую цепь, сходную по физико-химическим свойствам с исходной. Например, консервативными будут замены между аминокислотами с гидрофобными боковыми цепями (например, метионином, аланином, валином, лейцином и изолейцином), с кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновой и глутаминовой кислотами), с основными боковыми цепями (например, гистидином, лизином и аргинином), или с ароматическими боковыми цепями (например триптофаном, тирозином и фенилаланином). Как известно в данной области техники, консервативные замены обычно не приводят к значительным изменениям в трехмерной структуре белка и поэтому при таких заменах может сохраняться биологическая активность белка.

Термин «процент(%) идентичности» применительно к аминокислотной или нуклеотидной последовательности означает процентную долю аминокислотных/нуклеотидных остатков в представляющей интерес последовательности, которые идентичны аминокислотным/нуклеотидным остаткам в последовательности, взятой для сравнения (референсной), после выравнивания этих последовательностей, при необходимости, с введением пробелов, для достижения максимального количества идентичных аминокислотных/нуклеотидных остатков. Консервативные замены аминокислотных остатков можно рассматривать как не влияющие либо как влияющие на степень идентичности. Выравнивание последовательностей с целью определения процента их идентичности достигается с помощью, например, общедоступных компьютерных программ, например BLASTN, BLASTp (доступны на интернет-сайте Национального центра биотехнологической информации США (NCBI); см. также Altschul S.F. et al, *J. Mol. Biol.*, 215:403–410 (1990); Stephen F. et al, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389–3402 (1997)), ClustalW2 (доступна на интернет-сайте Европейского института биоинформатики; см. также Higgins D.G. et al, *Methods in Enzymology*, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. et al, *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(21): 2947-8 (2007)) и ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут пользоваться параметрами по умолчанию, предусмотренными данной программой, или же настраивать

их применительно к проводимому выравниванию, например подбирая подходящий алгоритм.

Термин «Т-клетки/Т-лимфоциты» в настоящем документе включает $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки, Т-хелперы типа 1, Т-хелперы типа 2, Т-хелперы типа 17 и ингибиторные Т-клетки.

Термин «эффекторные функции» в настоящем документе относится к биологическим активностям, обусловленным связыванием области Fc антитела с его эффекторами, такими как комплекс C1 рецептором для Fc. Примеры эффекторных функций включают цитотоксичность, зависимую от комплемента (CDC), которая индуцируется взаимодействием антител с C1q комплекса C1; антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC), которая индуцируется связыванием области Fc антитела с рецептором для Fc на эффекторной клетке; и фагоцитоз.

Термин «рак» или «раковое заболевание» в настоящем документе относится к любому медицинскому состоянию, обусловленному неоплазией или злокачественным клеточным ростом, пролиферацией или метастазированием; этот термин включает как заболевания с образованием солидных опухолей, так и состояния без таких опухолей, например лейкозы. Термин «опухоль» в настоящем документе относится к солидной массе неопластических и/или злокачественных клеток.

Термин «лечение» или «терапия» применительно к какому-либо медицинскому состоянию в настоящем документе включает предотвращение или облегчение этого состояния, замедление его возникновения или развития, снижение риска развития данного состояния, предотвращение или задержка развития связанных с ним симптомов, сокращение или прекращение симптомов, связанных с данным состоянием, обеспечение полной или частичной регрессии данного состояния, излечение данного состояния или комбинации перечисленного. Применительно к раку термин «лечение» или «терапия» может относиться к подавлению или замедлению неопластического или злокачественного клеточного роста, пролиферации или метастазирования, предотвращению или задержке развития неопластического или злокачественного клеточного роста, пролиферации или метастазирования или к комбинации перечисленного. Применительно к опухоли термин «лечение» или «терапия» может относиться к уничтожению всей или части опухоли, ингибированию или замедлению роста опухоли или метастазирования, предотвращению или задержке развития опухоли или к комбинации перечисленного.

Определение «выделенный/изолированный» применительно к какому-либо веществу подразумевает, что данное вещество в результате действий человека отлично от того, каким оно было в естественном (природном) состоянии. Если композиция или

вещество встречаются в природе, то, становясь изолированными, они изменяются или утрачивают свое исходное окружение, или и то, и другое. Например, полинуклеотид или полипептид, находясь в организме животного от природы, не являются изолированными, но тот же полинуклеотид или полипептид становится изолированным, если он в достаточной степени отделен от сопутствующих ему в природном состоянии субстанций, так что является в основном чистым. В некоторых воплощениях данного изобретения антитела и антиген-связывающие фрагменты, обладают чистотой по меньшей мере 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% при определении методами электрофореза (например, SDS-PAGE, изоэлектрического фокусирования, капиллярного электрофореза) или хроматографическими методами (например, путем ионообменной хроматографии или высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращенной фазе).

Термин «вектор» в настоящем документе относится к несущей структуре, в которую можно встроить полинуклеотид, кодирующий нужный белок, функционирующим образом, так чтобы происходила экспрессия этого белка. Чтобы происходила экспрессия включенного в вектор генетического материала в клетке нужно ввести последний в клетку-хозяин, что достигается путем трансформации, трансдукции или трансфекции. Примеры векторов включают плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы - например, дрожжевые искусственные хромосомы (YAC), бактериальные искусственные хромосомы (BAC) или искусственные хромосомы, происходящие из ДНК бактериофага P1 (PAC), бактериофаги, например фаг λ или M13, вирусы животных. К числу вирусов животных, используемых в качестве векторов, принадлежат ретровирусы (включая лентивирусы), аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, герпесвирусы (например, вирус простого герпеса), поксвирусы, бакуловирусы, папилломавирусы и паповавирусы (например, SV40). Вектор может содержать различные элементы для регуляции экспрессии, в том числе промоторные последовательности, сайты инициации транскрипции, энхансерные последовательности, элементы для возможности отбора репортерные гены. Кроме того, вектор может содержать сайт инициации репликации. В состав вектора также могут входить компоненты, способствующие его проникновению в клетку, в том числе (не ограничиваясь перечисленным здесь) вирусные частицы, липосомы или белковая оболочка.

Термин «клетка-хозяин» в настоящем документе относится к клеткам, в которые введен экзогенный полинуклеотид и/или вектор.

Формулировка «заболевание, ассоциированное или связанное с PD-1» в настоящем документе относится к любому состоянию, вызванному, усугубленному или иначе

связанному с повышенным либо пониженным уровнем экспрессии или активности белка PD-1 (например, человеческого PD-1).

Термин «терапевтически эффективное количество» или «эффективная дозировка» в настоящем документе относится к дозировке или концентрации лекарственного вещества, эффективной для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с человеческим PD-1. Например, применительно к описанным в настоящем документе антителам и антиген-связывающим фрагментам, терапевтически эффективное количество – это дозировка или концентрация антитела или антиген-связывающего фрагмента, способная вызвать полное или частичное уничтожение опухоли, подавление или замедление опухолевого роста, подавление клеточного роста или пролиферации клеток, обуславливающих раковое состояние, подавление метастазирование опухолевых клеток, ослабление любого симптома или маркера, ассоциированного с опухолью или раковым состоянием, предотвращение или задержку развития опухоли или ракового состояния или комбинацию из перечисленных явлений.

Термин «фармацевтически приемлемый» указывает, что данные носитель, несущая среда, разбавитель или иной эксципиент, и/или соль химически и/или физически в целом совместимы с другими ингредиентами, составляющими композицию по данному изобретению, и физиологически совместимы с организмом, в которые вводится эта композиция.

Антитела против PD-1

В одном из аспектов данного изобретения предлагаются антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты. Известно, что PD-1, обозначаемый также CD279, являющийся ключевым рецептором в контрольной точке иммунного ответа, экспрессируется в активированных Т-лимфоцитах, опосредующих иммуносупрессию. Лиганд 1 этого белка, а именно PD-L1 представляет собой трансмембранный белок с молекулярной массой 40 кДа, который экспрессируется в различных опухолевых клетках, а также в стромальных клетках или в тех и других. Ингибирование взаимодействия между PD-1 и PD-L1 может привести к усилению Т-клеточного ответа и таким образом обусловить противоопухолевую активность.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаются иллюстративные полностью человеческие моноклональные антитела 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.103.11-v2 hAb, 1.139.15 hAb и 1.153.7 hAb, участки CDR которых представлены в нижерасположенной таблице 1, после которой приведены последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи этих антител.

Таблица 1

	CDR1	CDR2	CDR3
1.7.3 hAb-VH(23466-VH)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:5
	STTTYWV	SISYSGNTYYNPSLKS	HLGYNGRYLPFDY
	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:6
	AGT ACT ACT TAC TAC TGG GTC	AGT GGG AAC ACC TAC TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT	CAT CTA GGG TAT AAT GGG AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC
1.7.3 hAb - VL(23195-VL)	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:11
	TGTSSDVGFYNYVS	DVTNRPS	SSYTSISTWV
	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:12
	ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT TTT TAT AAC TAT GTC TCC	GAT GTC ACT AAT CGG CCC TCA	AGC TCA TAT ACA AGC ATC AGC ACT TGG GTG
1.49.9 hAb - VH(20951-VH)	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:5
	SSTYYWG	SISYSGSTYYNPSLKS	HLGYNGRYLPFDY
	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:6
	AGT AGT ACT TAC TAC TGG GGC	AGT ATC TCT TAT AGT GGG AGC ACC TAC TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT	CAT CTA GGG TAT AAT GGG AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC
1.49.9 hAb - VH(20951-VL)	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:11
	TGTSSDVGFYNYVS	DVSNRPS	SSYTSISTWV
	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:12
	ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT TTT TAT AAC TAT GTC TCC	GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA	AGC TCA TAT ACA AGC ATC AGC ACT TGG GTG
1.103.11 hAb -VH(20975-VH)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:5
	STTTYWV	SISYSGSTYYNPSLKS	HLGYNGRYLPFDY

	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:6
	AGT ACT ACT TAC TAC TGG GTC	AGT ATC TCT TAT AGT GGG AGC ACC TAC TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT	CAT CTA GGG TAT AAT GGG AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC
1.103.11 hAb -VH(20975- VL)	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:19
	TGTSSDVGFYNYVS	DVSNRPS	SSYTNISTWV
	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:20
	ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT TTT TAT AAC TAT GTC TCC	GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA	AGC TCA TAT ACA AAC ATC AGC ACT TGG GTG
1.139.15 hAb -VH(23521- VH)	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:25
	STTYWYG	SISYSGTTYYNPSLKS	HLGYNSNWYFPDY
	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:26
	AGT ACT ACT TAC TAC TGG GGC	AGT ATC TCT TAT AGT GGG ACC ACC TAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT	CAT CTC GGG TAT AAC AGC AAC TGG TAC CCT TTT GAC TAC
1.139.15 hAb -VH(23521- VL)	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:31
	TGTSSDVGSYNRVS	EVSNRPS	SSYTSSSTWV
	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:32
	ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT AGT TAT AAC CGT GTC TCC	GAG GTC AGT AAT CGG CCC TCA	AGC TCA TAT ACA AGC AGC AGC ACT TGG GTG
1.153.7 hAb – H(20942-VH)	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:37
	SHAMS	TITGGGGSIIYADSVKG	NRAGEGYFDY
	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:38
	AGC CAT GCC ATG AGC	ACT ATT ACT GGT GGT GGT GGT AGC ATA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC	AAC CGC GCT GGG GAG GGT TAC TTT GAC TAC
1.153.7 hAb - VH(20942- VL)	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:43
	GGDNIGNKDVH	RDSNRPS	QVWDSIWV
	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:44

	GGG GGA GAC AAC ATT GGA AAT AAA GAT GTG CAC	AGG GAT AGC AAC CGG CCC TCT	CAG GTG TGG GAC AGC ATT TGG GTG
1.103.11-v2 hAb- VH(20975- VH)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:5
	STTTYWV	SISYSGSTYYNPSLKS	HLGYNGRYLPFDY
	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:6
	AGT ACT ACT TAC TAC TGG GTC	AGT ATC TCT TAT AGT GGG AGC ACC TAC TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT	CAT CTA GGG TAT AAT GGG AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC
1.103.11-v2 hAb - VH(20975-2- VL)	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:65
	TGTSSDVGFYNYVS	DVSNRPS	SSYTSISTWV
	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:66
	ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT TTT TAT AAC TAT GTC TCC	GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA	AGC TCA TAT ACA AGC ATC AGC ACT TGG GTG

1.7.3 hAb -VH(23466-VH): (аминокислотная последовательность - SEQ ID NO:45; нуклеотидная последовательность - SEQ ID NO:46); аминокислотные последовательности участков CDR 1-3 - SEQ ID NO 1, 3, 5, их нуклеотидные последовательности - SEQ ID NO:2, 4, 6, соответственно:

Сегмент V - IGHV4-39*01

Сегмент D - IGHD1-26*01

Сегмент J - IGHJ4*02

Q L Q L Q E S G P G L V K P S
 1 CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG

E T L T L T C T V S G D S I S
 46 GAG ACC CTG ACC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GAC TCC ATC AGC

CDR1

S T T Y Y W V W I R Q P P G K
 91 AGT ACT ACT TAC TAC TGG GTC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG

CDR2

G L E W I G S I S Y S G N T Y
 136 GGA CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TCT TAT AGT GGG AAC ACC TAC

CDR2

Y N P S L K S R V T I S V D T
 181 TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCC GTA GAC ACG

S K N H F S L K L S S V A A T
 226 TCC AAG AAC CAC TTC TCC CTG AAG CTG AGT TCT GTG GCC GCC ACA

CDR3

D T A L Y Y C A R H L G Y N G
 271 GAC ACG GCT CTA TAT TAC TGT GCG AGA CAT CTA GGG TAT AAT GGG

CDR3

R Y L P F D Y W G Q G T L V T
 316 AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC

V S S (SEQ ID NO: 45)
 361 GTC TCC TCC (SEQ ID NO: 46)

1.7.3 hAb-VL(23195-VL): (аминокислотная последовательность - SEQ ID NO:47; нуклеотидная последовательность - SEQ ID NO:48) аминокислотные последовательности участков CDR1-3 легкой цепи - SEQ ID NO: 7, 9, 11, их нуклеотидные последовательности SEQ ID NO:8, 10, 12 соответственно:

Сегмент V - IGLV2-14*01

Сегмент J - IGLJ3*02

1 Q S A L T Q P A S V S G S P G
CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA

CDR1

46 Q S I T I S C T G T S S D V G
CAG TCG ATC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT

CDR1

91 F Y N Y V S W Y Q Q H P G K A
TTT TAT AAC TAT GTC TCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA GGC AAA GCC

CDR2

136 P E L M I Y D V T N R P S G V
CCC GAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC ACT AAT CGG CCC TCA GGG GTT

181 S D R F S G S K S G N T A S L
TCT GAT CGC TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG

226 T I S G L Q A E D E A D Y Y C
ACC ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC

CDR3

261 S S Y T S I S T W V F G G G T
AGC TCA TAT ACA AGC ATC AGC ACT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC

316 K L T V L (SEQ ID NO: 47)
AAG CTG ACC GTC CTA (SEQ ID NO: 48)

1.49.9 hAb -VH(20951-VH): (аминокислотная последовательность - SEQ ID NO:49; нуклеотидная последовательность - SEQ ID NO:50) аминокислотные последовательности участков CDR 1-3 тяжелой цепи - SEQ ID NO: 13, 15, 5, их нуклеотидные последовательности SEQ ID NO:14, 16, 6, соответственно:

Сегмент V - IGHV4-3 -9*01

Сегмент D - IGHD1-26*01

Сегмент J - IGHJ4*02

Q L Q L Q E S G P G L V K P S
 1 CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG

E T L S L T C T V S G G S I S
 46 GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC

CDR1

~~~~~  
 S S T Y Y W G W I R Q P P G K  
 91 AGT AGT ACT TAC TAC TGG GGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG

## CDR2

~~~~~  
 G L E W I G S I S Y S G S T Y
 136 GGA CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TCT TAT AGT GGG AGC ACC TAC

CDR2

~~~~~  
 Y N P S L K S R V T I S V D T  
 181 TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCC GTA GAC ACG

S K N Q F S L K L S S V T D A  
 226 TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GAC GCA

## CDR3

~~~~~  
 D T A V Y Y C A R H L G Y N G
 261 GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA CAT CTA GGG TAT AAT GGG

CDR3

~~~~~  
 R Y L P F D Y W G Q G T L V T  
 316 AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC

V S S (SEQ ID NO: 49)  
 361 GTC TCC TCC (SEQ ID NO: 50)

1.49.9 hAb -VL(21526-VL): (аминокислотная последовательность - SEQ ID NO:51;  
 нуклеотидная последовательность - SEQ ID NO:52) аминокислотные последовательности

участков CDR легкой цепи 1-3 - SEQ ID NO: 7, 17, 11, их нуклеотидные последовательности SEQ ID NO:8, 18, 12, соответственно:

Сегмент V - IGLV2-14\*01

Сегмент J - IGLJ3\*02

Q S A L T Q P A S V S G S P G  
1 CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA

CDR1

Q S I T I S C T G T S S D V G  
46 CAG TCG ATC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT

CDR1

F Y N Y V S W Y Q Q H P G K A  
91 TTT TAT AAC TAT GTC TCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA GGC AAA GCC

CDR2

P E V M I Y D V S N R P S G V  
136 CCC GAA GTC ATG ATT TAT GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA GGG GTT

S D R F S G S K S G N T A S L  
181 TCT GAT CGC TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG

T I S G L Q A E D E A D Y Y C  
226 ACT ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC

CDR3

S S Y T S I S T W V F G G G T  
261 AGC TCA TAT ACA AGC ATC AGC ACT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC

K L T V L (SEQ ID NO: 51)  
316 AAG CTG ACT GTC CTA (SEQ ID NO: 52)

1.103.11 hAb -VH(20975-VH): (аминокислотная последовательность - SEQ ID NO:53; нуклеотидная последовательность - SEQ ID NO:54) аминокислотные последовательности участков CDR 1-3 тяжелой цепи - SEQ ID NO: 1, 15, 5, их

нуклеотидные последовательности SEQ ID NO:2, 16, 6, соответственно:

Сегмент V - IGHV4-3 -9\*01

Сегмент D - IGHD1-26\*01

Сегмент J - IGHJ4\*02

Q L Q L Q E S G P G L V K P S  
1 CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG

E T L T L T C T V S A D S I S  
46 GAG ACC CTG ACC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GCT GAC TCC ATC AGC

CDR1

S T T Y Y W V W I R Q P P G K  
91 AGT ACT ACT TAC TAC TGG GTC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG

CDR2

G L E W I G S I S Y S G S T Y  
136 GGA CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TCT TAT AGT GGG AGC ACC TAC

CDR2

Y N P S L K S R V T V S V D T  
181 TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC GTA TCC GTA GAC ACG

S K N Q F S L K L N S V A A T  
226 TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AAC TCT GTG GCC GCC ACA

CDR3

D T A L Y Y C A R H L G Y N G  
261 GAC ACG GCT CTA TAT TAC TGT GCG AGA CAT CTA GGG TAT AAT GGG

CDR3

R Y L P F D Y W G Q G T L V T  
316 AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC

V S S (SEQ ID NO: 53)  
361 GTC TCC TCC (SEQ ID NO: 54)

1.103.11 hAb -VL(21038-VL): (аминокислотная последовательность - SEQ ID NO:55; нуклеотидная последовательность - SEQ ID NO:56) аминокислотные последовательности участков CDR 1-3 легкой цепи - SEQ ID NO: 7, 17, 19, их нуклеотидные последовательности SEQ ID NO:8, 18, 20, соответственно:

Сегмент V - IGLV2-14\*01

Сегмент J - IGLJ3\*02

Q S A L T Q P A S V S G S P G  
1 CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA

CDR1

Q S I T I S C T G T S S D V G  
46 CAG TCG ATC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT

CDR1

F Y N Y V S W Y Q Q H P G K A  
91 TTT TAT AAC TAT GTC TCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA GGC AAA GCC

CDR2

P E L M I Y D V S N R P S G V  
136 CCC GAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA GGG GTT

S D R F S G S K S G N T A S L  
181 TCT GAT CGC TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG

T I S G L Q A E D E A D Y Y C  
226 ACC ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC

CDR3

S S Y T N I S T W V F G G G T  
261 AGC TCA TAT ACA AAC ATC AGC ACT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC

K L T V L (SEQ ID NO: 55)  
316 AAG CTG ACC GTC CTA (SEQ ID NO: 56)

1.139.15 hAb -VH(23521-VH) (аминокислотная последовательность - SEQ ID NO:57; нуклеотидная последовательность - SEQ ID NO:58) аминокислотные последовательности участков CDR 1-3 - SEQ ID NO: 21, 23, 25, их нуклеотидные последовательности SEQ ID NO:22, 24, 26, соответственно:

Сегмент V - IGHV4-3 -9\*01

Сегмент D - IGHD6-13\*01

Сегмент J - IGHJ4\*02

Q L Q L Q E S G P G L V K P S  
1 CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCC TCG

E T L S L T C T V S G G S I S  
46 GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC

CDR1

~~~~~  
S T T Y Y W G W I R Q P P G K
91 AGT ACT ACT TAC TAC TGG GGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG

CDR2

~~~~~  
G L E W I G S I S Y S G T T Y  
136 GGG CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TCT TAT AGT GGG ACC ACC TAC

## CDR2

~~~~~  
 Y N P S L K S R V T I P V D T
 181 TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATC CCC GTA GAC ACG

S K N Q I S L K L S S V T A A
 226 TCC AAG AAC CAG ATC TCC CTG AAA CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCA

CDR3

~~~~~  
 D T S L Y Y C A R H L G Y N S  
 261 GAC ACG TCT TTG TAT TAT TGT GCG AGA CAT CTC GGG TAT AAC ACG

## CDR3

~~~~~  
 N W Y P F D Y W G Q G T L V T
 316 AAC TGG TAC CCT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC

V S S (SEQ ID NO: 57)
 361 GTC TCC TCA (SEQ ID NO: 58)

1.139.15 hAb -VL(22895-VL) (аминокислотная последовательность - SEQ ID NO:59; нуклеотидная последовательность - SEQ ID NO:60) аминокислотные последовательности участков CDR 1-3 легкой цепи - SEQ ID NO: 27, 29, 31, их нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 28, 30, 32, соответственно:

Сегмент V - IGLV2-18*02

Сегмент J - IGLJ3*02

Q S A L T Q P P S V S G S P G
 1 CAG TCG GCC CTG ACT CAG CCT CCC TCC GTG TCC GGG TCT CCT GGA

CDR1

Q S V T I S C T G T S S D V G
 46 CAG TCA GTC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT

CDR1

S Y N R V S W Y Q Q P P G T A
 91 AGT TAT AAC CGT GTC TCC TGG TAC CAG CAG CCC CCA GGC ACA GCC

CDR2

P E V I I Y E V S N R P S G V
 136 CCC GAA GTC ATT ATT TAT GAG GTC AGT AAT CGG CCC TCA GGG GTC

P D R F S G S K S G N T A S L
 181 CCT GAT CGC TTC TCT GGG TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG

T I S G L Q A E D E A D Y Y C
 226 ACC ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC

CDR3

S S Y T S S S T W V F G G G T
 261 AGC TCA TAT ACA AGC AGC AGC ACT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC

K L T V L (SEQ ID NO: 59)
 316 AAG CTG ACC GTC CTA (SEQ ID NO: 60)

1.153.7 hAb -VH(20942-VH): (аминокислотная последовательность - SEQ ID NO:61; нуклеотидная последовательность - SEQ ID NO:62) аминокислотные последовательности участков CDR 1-3 тяжелой цепи - SEQ ID NO: 33, 35, 37, их нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 34, 36, 38, соответственно:

Сегмент V - IGHV3-23*01

Сегмент D - IGHD7-27*01

Сегмент J - IGJ4*02

1 E V Q L L E S G G G L V Q P G
GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG

46 G S L R L S C A A S G F T F S
GGG TCC CTG AGA CTG TCC TGC GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC

CDR1

91 S H A M S W V R Q A P G K G L
AGC CAT GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG

CDR2

136 E W V S T I T G G G G S I Y Y
GAG TGG GTC TCA ACT ATT ACT GGT GGT GGT GGT AGC ATA TAC TAC

CDR2

181 A D S V K G R F T I S R D N S
GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC

226 K N T L Y L Q M N S L R A E D
AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

CDR3

261 T A V Y Y C A K N R A G E G Y
ACG GCC GTA TAT TAT TGT GCG AAA AAC CGC GCT GGG GAG GGT TAC

CDR3

61) F D Y W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO:
316 TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA (SEQ ID NO:
62)

1.153.7 hAb -VL(21110-VL) (аминокислотная последовательность - SEQ ID NO:63; нуклеотидная последовательность - SEQ ID NO:64) аминокислотные последовательности участков CDR 1-3 легкой цепи - SEQ ID NO: 39, 41, 43 , их нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 40, 42, 44 соответственно:

Сегмент V - IGLV3-9*01

Сегмент J - IGLJ3*02

1 S Y E L T Q P L S V S V A L G
TCC TAT GAG CTG ACT CAG CCA CTC TCA GTG TCA GTG GCC CTG GGA

CDR1

46 Q T A R I T C G G D N I G N K
CAG ACG GCC AGG ATT ACC TGT GGG GGA GAC AAC ATT GGA AAT AAA

CDR1

91 D V H W Y Q Q K P G Q A P V L
GAT GTG CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGC CAG GCC CCT GTG CTG

CDR2

136 V I Y R D S N R P S G I P E G
GTC ATC TAT AGG GAT AGC AAC CGG CCC TCT GGG ATC CCT GAG GGA

181 F S G S N S G N T A T L T I S
TTC TCT GGC TCC AAC TCG GGG AAC ACG GCC ACC CTG ACC ATC AGC

CDR3

226 R A Q A G D E A D Y Y C Q V W
AGA GCC CAA GCC GGG GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT CAG GTG TGG

CDR3

261 D S I W V F G G G T K L T V L (SEQ ID NO: 63)
GAC AGC ATT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA (SEQ ID NO: 64)

1.103.11-v2 hAb -VH(20975-VH): (аминокислотная последовательность - SEQ ID NO:53; нуклеотидная последовательность - SEQ ID NO:54) аминокислотные последовательности участков CDR 1-3 тяжелой цепи - SEQ ID NO: 1, 15, 5, их нуклеотидные последовательности SEQ ID NO:2, 16, 6, соответственно:

Сегмент V - IGHV4-3 -9*01

Сегмент D - IGHD1-26*01

Сегмент J - IGHJ4*02

Q L Q L Q E S G P G L V K P S
1 CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG

E T L T L T C T V S A D S I S
46 GAG ACC CTG ACC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GCT GAC TCC ATC AGC

CDR1

~~~~~  
S T T Y Y W V W I R Q P P G K  
91 AGT ACT ACT TAC TAC TGG GTC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG

CDR2

~~~~~  
G L E W I G S I S Y S G S T Y
136 GGA CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TCT TAT AGT GGG AGC ACC TAC

CDR2

Y N P S L K S R V T V S V D T
 181 TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC GTA TCC GTA GAC ACG

S K N Q F S L K L N S V A A T
 226 TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AAC TCT GTG GCC GCC ACA

CDR3

D T A L Y Y C A R H L G Y N G
 261 GAC ACG GCT CTA TAT TAC TGT GCG AGA CAT CTA GGG TAT AAT GGG

CDR3

R Y L P F D Y W G Q G T L V T
 316 AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC

V S S (SEQ ID NO: 53)
 361 GTC TCC TCC (SEQ ID NO: 54)

1.103.11-v2 hAb -VL(21038-2-VL): (аминокислотная последовательность - SEQ ID NO:67; нуклеотидная последовательность - SEQ ID NO:68) аминокислотные последовательности участков CDR 1-3 легкой цепи - SEQ ID NO: 7, 17, 65, их нуклеотидные последовательности SEQ ID NO:8, 18, 66, соответственно:

Сегмент V - IGLV2-14*01

Сегмент J - IGLJ3*02

Q S A L T Q P A S V S G S P G
 1 CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA

CDR1

Q S I T I S C T G T S S D V G
 46 CAG TCG ATC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT

CDR1

F Y N Y V S W Y Q Q H P G K A
 91 TTT TAT AAC TAT GTC TCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA GGC AAA GCC

CDR2

P E L M I Y D V S N R P S G V
 136 CCC GAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA GGG GTT

S D R F S G S K S G N T A S L
 181 TCT GAT CGC TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG

T I S G L Q A E D E A D Y Y C
 226 ACC ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC

CDR3

S S Y T S I S T W V F G G G T
 261 AGC TCA TAT ACA AGC ATC AGC ACT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC

K L T V L (SEQ ID NO: 67)
 316 AAG CTG ACC GTC CTA (SEQ ID NO: 68)

В некоторых воплощениях данного изобретения антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, содержат последовательности CDR тяжелых цепей, которые выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 13, 15, 21, 23, 25, 33, 35 и 37. В некоторых воплощениях данного изобретения антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, содержат последовательности CDR легких цепей, которые

выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 9, 11, 17, 19, 27, 29, 31, 39, 41, 43 и 65. В некоторых воплощениях данного изобретения одна или более последовательностей участков CDR, предлагаемых в настоящем документе, могут быть модифицированы или изменены так, что одно или более свойств получаемого в результате антитела становятся лучше, чем у исходного антитела (например, усиливается связывание с антигеном, нужным образом изменяется паттерн гликозилирования, снижается риск гликозилирования аминокислотных остатков в составе участков CDR, уменьшается дезаминирование аминокислотных остатков в составе участков CDR, улучшаются фармакокинетические показатели, в частности возрастает время полужизни, нужным образом изменяется чувствительность к pH, расширяются возможности образования конъюгата), причем в остальном новое антитело сравнимо с исходным (то есть с антителом, у которого аминокислотные последовательности участков CDR те же, за исключением упомянутых модификаций или изменений), или по меньшей мере в основном сохраняется способность связываться с антигеном, как у исходного антитела.

В некоторых воплощениях данного изобретения антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, содержат вариабельную область тяжелой цепи, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3 и/или 5; вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 13, 15 и/или 5; вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 1, 15, и/или 5; вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 21, 23 и/или 25; вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 33, 35 и/или 37.

В некоторых воплощениях данного изобретения антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, содержат вариабельную область легкой цепи, выбираемую из группы, состоящей из вариабельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 7, 9 и/или 11; вариабельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 7, 17 и/или 11; вариабельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 7, 17 и/или 19; вариабельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 27, 29 и/или 31; вариабельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 39, 41 и/или 43; вариабельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 7, 17 и/или 65.

В некоторых воплощениях данного изобретения антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, содержат а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательности SEQ ID NO: 1, 3 и/или 5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, 9 и/или 11; б) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 13, 15 и/или 5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, 17 и/или 11; в) вариабельную область тяжелой цепи,

содержащую SEQ ID NO: 1, 15, и/или 5, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности SEQ ID NO: 7, 17 и/или 19; d) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 21, 23 и/или 25, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 27, 29 и/или 31; e) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 33, 35 и/или 37, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39, 41 и/или 43; f) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, 15, и/или 5, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, 17 и/или 65.

Специалистам в данной области техники должно быть ясно, что последовательности участков CDR, представленные в таблице 1, могут быть модифицированы или в них могут быть одна или более аминокислотных замен для достижения улучшения биологической активности, например усиления аффинности связывания с человеческим PD-1. Например, можно создать библиотеку вариантов антител (например, вариантов Fab или cFv), обеспечить их экспрессию посредством технологии фагового дисплея, и затем осуществить скрининг по аффинности связывания с человеческим PD-1. Можно также с помощью программного обеспечения моделировать связывание антител с человеческим PD-1 и идентифицировать в молекуле антитела аминокислотные остатки, формирующие поверхность связывания с антигеном. Для замены такие аминокислотные остатки либо не трогают во избежание снижения аффинности связывания, либо, наоборот, избирают мишенью замены, если таковая может обеспечить лучшее связывание. В некоторых воплощениях данного изобретения по меньшей мере одна (или все) аминокислотные замены в участках CDR являются консервативными.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела и их антиген-связывающие фрагменты, содержат одну или более аминокислотных последовательностей CDR по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) идентичную последовательности (одной или более), представленной в таблице 1, сохраняя при этом такую же или даже более высокую аффинность связывания с человеческим PD-1, что и исходное антитело, в котором имеются в основном такие же аминокислотные последовательности, за исключением того, что соответствующие последовательности CDR на 100% идентичны последовательности (одной или более), представленной в таблице 1.

В некоторых воплощениях данного изобретения антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, являются полностью человеческими. Полностью

человеческие антитела не обладают иммуногенностью для человека и/или пониженной аффинностью связывания, что часто наблюдается у гуманизированных антител.

В некоторых воплощениях данного изобретения полностью человеческие антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, содержат вариабельную область тяжелой цепи, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, 49, 53, 57, 61 и гомологичных им последовательностей, которые по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) идентичны им; и/или вариабельную область легкой цепи, выбираемую из группы, состоящей SEQ ID NO: 47, 51, 55, 59, 63, 67 и гомологичных им последовательностей, которые по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) идентичны им. У этих полностью человеческих антител сохраняется аффинность связывания с человеческим PD-1, предпочтительно на уровне, близком к таковому антител 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.103.11-v2 hAb, 1.139.15 hAb и 1.153.7 hAb.

В некоторых воплощениях данного изобретения полностью человеческие антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, содержат а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 45; и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 47; б) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 49; и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 51; в) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 53; и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 55; д) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 57; и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 59; е) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 61; и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 63; или ф) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 53; и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 67.

В настоящем документе рассматриваются также антитела и их антиген-связывающие фрагменты, которые конкурируют за один эпитоп с описанными здесь антителами против PD-1 и их антиген-связывающими фрагментами. В некоторых воплощениях данного изобретения эти антитела блокируют связывание антител 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.103.11-v2 hAb, 1.139.15 hAb или 1.153.7 hAb с человеческим или обезьяньим PD-1, причем это блокирование характеризуется IC_{50} (то есть концентрацией 50%-ного ингибирования) менее 10^{-6} М, менее 10^{-7} М, менее $10^{-7.5}$ М, менее 10^{-8} М, менее $10^{-8.5}$ М, менее 10^{-9} М, или менее 10^{-10} М. Значения величины IC_{50} определяют путем конкурентного анализа, типа ELISA, конкурентного анализа с

использованием радиоактивно меченного лиганда и FACS анализа.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые в настоящем документе антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, способны специфично связываться с человеческим PD-1, причем аффинность связывания (K_D) составляет $\leq 10^{-6}$ М (например, $\leq 5 \times 10^{-7}$ М, $\leq 2 \times 10^{-7}$ М, $\leq 10^{-7}$ М, $\leq 5 \times 10^{-8}$ М, $\leq 2 \times 10^{-8}$ М, $\leq 10^{-8}$ М, $\leq 5 \times 10^{-9}$ М, $\leq 2 \times 10^{-9}$ М, $\leq 10^{-9}$ М, 10^{-10} М) при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса. Аффинность связывания может быть охарактеризовано величиной K_D , которая рассчитывается как отношение скорости диссоциации к скорости ассоциации (k_{off}/k_{on}) при достижении равновесия реакции связывания антигена со связывающим его агентом. Аффинность связывания антигена (например, характеризуемое K_D) определяют каким-либо подходящим из известных в данной области техники методов, включая, например метод поверхностного плазмонного резонанса с использованием, например, системы Biacore (см., например, Murphy, M. et al, Current protocols in protein science, Chapter 19, unit 19.14, 2006).

В некоторых воплощениях данного изобретения связывание предлагаемых в настоящем документе антител и их антиген-связывающих фрагментов с человеческим PD-1 характеризуется EC_{50} (концентрацией 50%-ного связывания) в диапазоне 0,1 нМ -100 нМ (например, 0,1 нМ -50 нМ; 0,1 нМ -30 нМ; 0,1 нМ -20 нМ; 0,1 нМ -10 нМ или 0,1 нМ -1 нМ), Связывание антител с человеческим PD-1 количественно определяют с помощью известных в данной области техники методов, например сэндвич-анализа типа ELISA, Вестерн-блоттинга, FACS или другими методами, применяемыми для измерения связывания. В одном из иллюстративных примеров по данному изобретению допускают связывание испытываемого антитела (например, первого антитела) с иммобилизованным человеческим PD-1 или с клетками, в которых экспрессируется человеческий PD-1, затем отмывают не связавшиеся антитела, вносят меченое второе антитело, которое связывается с первым антителом и тем самым позволяет детектировать его. В случае иммобилизованного PD-1 при детекции используют микропланшет-ридер, а в случае клеток, в которых экспрессируется человеческий PD-1 применяют метод FACS. В некоторых воплощениях данного изобретения связывание предлагаемых в настоящем документе антител и их антиген-связывающих фрагментов с человеческим PD-1 характеризуется EC_{50} (50% эффективной концентрацией) от 1 нМ до 10 нМ или от 1 нМ до 5 нМ при измерении методом FACS.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые в настоящем документе антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, ингибируют связывание человеческого PD-1 с его лигандом с IC_{50} составляющей 0,2 нМ-100 нМ

(например, 0,2 нМ-50 нМ; 0,2 нМ-30 нМ; 0,2 нМ-20 нМ; 0,2 нМ-10 нМ или 1 нМ-10 нМ) при измерении конкурентным методом.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые в настоящем документе антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, блокируют связывание человеческого PD-1 с его лигандом и тем самым биологические активности, в том числе, например, продуцирование цитокинов активированными Т-лимфоцитами (например, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками), индукцию пролиферации активированных Т-лимфоцитов (например, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток) и обращение супрессивного действия T_{reg}. Примеры цитокинов включают IL-2 и IFN γ . Термин IL-2 относится к интерлейкину-2, () одному из цитокинов, который является сигнальной молекулой иммунной системы, регулирующей активность белых клеток крови (например, лейкоцитов). Термин «гамма-интерферон» (IFN γ) относится к цитокину, производимому естественными киллерами (NK-клетками), Т-лимфоцитами CD4⁺ и CD8⁺Т, являющемуся важнейшим активатором макрофагов и вызывающему экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС). Образование цитокина можно определить, применяя известные в данной области техники методы, например, ELISA. Также можно использовать методы для определения пролиферации Т-лимфоцитов, например, анализ включения [³H]-тимидина.

Антитела против PD-1 по данному изобретению и их антиген-связывающие фрагменты, специфичны в отношении PD-1. В некоторых воплощениях данного изобретения эти антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, не связываются с CD28 и/или с CTLA-4. Например, аффинность связывания указанных антител и их фрагментов с CD28 и/или CTLA-4 составляет менее 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% от аффинности связывания их с PD-1.

В некоторых воплощениях данного изобретения антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, связываются с обезьяньим PD-1 с EC₅₀ не более 100 нМ, например не более или около 10 нМ; 9 нМ; 8 нМ; 7 нМ; 6 нМ; 5 нМ; 4 нМ; 3 нМ; 2 нМ; 1 нМ; 0,9 нМ; 0,8 нМ; 0,7 нМ; 0,6 нМ; 0,5 нМ; 0,4 нМ; 0,3 нМ; 0,2 нМ; 0,1 нМ; 0,09 нМ; 0,08 нМ; 0,07 нМ; 0,06 нМ; 0,05 нМ; 0,04 нМ; 0,03 нМ; 0,02 нМ или 0,01 нМ по данным ELISA. В некоторых воплощениях данного изобретения связывание антител против PD-1 и их антиген-связывающих фрагментов с обезьяньим PD-1 характеризуется EC₅₀ около 1 нМ -10 нМ.

В некоторых воплощениях данного изобретения антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, не связываются с мышинным PD-1, но связываются с обезьяньим PD-1, причем в последнем случае аффинность связывания сходно с таковым

для человеческого PD-1. Например, связывание антител из примеров по данному изобретению 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.103.11-v2 hAb, 1.139.15 hAb и 1.153.7 hAb с мышинным PD-1 не детектируется обычными методами определения связывания, например ELISA или FACS, в то время как связывание этих антител с обезьяньим PD-1 происходит с такой же аффинностью и величиной EC50, что и их связывание с человеческим PD-1 по данным, полученным путем ELISA или FACS.

В некоторых воплощениях данного изобретения антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, ослабляли или нивелировали эффекторные функции. В некоторых воплощениях данного изобретения антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, содержали константную область изотипа IgG4, которая обуславливала ослабление или нивелирование эффекторных функций. Такие эффекторные функции, как ADCC и CDC приводят к цитотоксичности в отношении клеток, в которых экспрессируется PD-1. В норме во многих клетках, например, в Т-лимфоцитах, экспрессируется PD-1. Чтобы избежать возможной нежелательной токсичности в отношении нормальных клеток, в некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые антитела и их антиген-связывающие фрагменты, обладают ослабленными эффекторными функциями или вообще лишены их. Для оценки таких активностей, как ADCC или CDC, применяются различные методы, например определение связывания с рецептором Fc, определение связывания с C1q и определение лизиса клеток; специалисту в данной области техники не составит труда выбрать подходящий метод. Не вдаваясь в теорию, отметим, что антитела, у которых эффекторные функции, например способность вызывать ADCC или CDC, ослаблены или отсутствуют, не индуцируют или индуцируют в минимальной степени цитотоксичность в отношении клеток, в которых экспрессируется PD-1, например Т-лимфоцитов, и таким образом их использование не сопряжено с нежелательными побочными эффектами, но в то же время блокирование PD-1 стимулирует иммунную систему к борьбе с такими состояниями, как рак или хроническая инфекция.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые в настоящем документе антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, обладают ослабленными побочными эффектами. Например, эти антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, содержат аминокислотную последовательность полностью человеческого IgG и поэтому их иммуногенность меньше, чем у соответствующих гуманизированных антител. Например, предлагаемые в настоящем документе антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, могут быть представлены изотипом IgG4 для того, чтобы исключить ADCC и CDC.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые в настоящем документе антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, обладают тем преимуществом, что их можно использовать в сочетании с иммуногенными агентами, например с опухолевыми клетками, очищенными опухолевыми антигенами, с трансфицированными клетками, несущими гены, которые кодируют иммуностимулирующие цитокины, с противоопухолевыми вакцинами. Также эти антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, могут использоваться в комбинированной терапии, в том числе вместе со стандартной химио- и лучевой терапией, с терапией на основе «малых молекул», имеющих определенные мишени; в результате складываются другие терапевтические подходы, предполагающие модулирующее воздействие на контрольные точки иммунного ответа. В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые в настоящем документе антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, используются как основа для конъюгатов антител с лекарственными агентами, биспецифичных или поливалентных антител.

Предлагаемые в настоящем документе антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, могут быть представлены моноклональными антителами, поликлональными антителами, полностью человеческими антителами, гуманизированными антителами, химерными антителами, рекомбинантными антителами, биспецифичными антителами, мечеными антителами, бивалентными антителами или антиидиотипическими антителами. Рекомбинантные антитела - это антитела, получаемые генно-инженерным путем *in vitro*, а не в животном организме. Биспецифичные или бивалентные антитела – это искусственные антитела, в которых имеются фрагменты двух различных моноклональных антител и которые способны связываться с двумя различными антигенами. Бивалентные антитела или антиген-связывающие фрагменты содержат по два сайта связывания антигена. Эти два антигенсвязывающих участка могут связываться с одним антигеном или же с разными антигенами; в последнем случае антитело или фрагмент антитела называются биспецифичным.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые в настоящем документе антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, являются полностью человеческими антителами. В некоторых воплощениях данного изобретения полностью человеческие антитела получают с помощью генно-инженерных методов. Например, вводят гены человеческих иммуноглобулинов или содержащие их хромосомы животным, типа мыши, так что эти трансгенные животные после иммунизации соответствующим антигеном (например, человеческим PD-1) способны производить полностью человеческие антитела. Полностью человеческие антитела можно выделить из

трансгенных животных или же их можно получить, используя технологию гибридом, где сливают клетки селезенки трансгенного животного с клетками какой-либо бессмертной линии, чтобы получились гибридомы, секретирующие полностью человеческие антитела. Примеры таких трансгенных животных включают (не ограничиваясь перечисленным здесь) крыс OmniRat, у которых эндогенная экспрессия генов крысиных иммуноглобулинов подавлена, и в тоже время они несут функциональные локусы рекомбинантных человеческих иммуноглобулинов; мышей OmniMouse, у которых эндогенная экспрессия генов мышинных иммуноглобулинов подавлена, и в тоже время они несут функциональные локусы рекомбинантных человеческих иммуноглобулинов с делецией в локусе J и мутацией С-каппа; трансгенных крыс OmniFlic, у которых эндогенная экспрессия генов крысиных иммуноглобулинов подавлена, и в тоже время они несут функциональные локусы рекомбинантных человеческих иммуноглобулинов с одной общей перестроенной легкой цепью VkJk и функциональной тяжелой цепью. Подробные сведения по этому вопросу можно найти в следующих работах: Osborn M. et al, *Journal of Immunology*, 2013, 190: 1481-90; Ma B. et al, *Journal of Immunological Methods* 400–401 (2013) 78-86; Geurts A. et al, *Science*, 2009, 325:433; патент США № 8,907,157; Европейский патент № 2152880B1; Европейский патент № 2336329B1, которые полностью включаются в настоящий документ путем отсылки. Можно использовать и других трансгенных животных, например мышей HuMab (подробно см. в работе Lonberg, N. et al. *Nature* 368(6474): 856 859 (1994)), Xeno-Mouse (Mendez et al. *Nat Genet.*, 1997, 15:146–156), TransChromo Mouse (Ishida et al. *Cloning Stem Cells*, 2002, 4:91–102), мыши VelocImmune (Murphy et al. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2014, 111:5153–5158), Kymouse (Lee et al. *Nat. Biotechnol.*, 2014, 32:356–363), и трансгенные кролики (Flisikowska et al. *PLoS One*, 2011, 6:e21045).

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые в настоящем документе антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, являются камелизированными однодоменными антителами, дителами, scFv, димерами scFv, BsFv, dsFv, (dsFv)² или dsFv-dsFv', фрагментами Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ дителами, нанотелами, доменными антителами или бивалентными доменными антителами.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые в настоящем документе антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, содержат также константную область иммуноглобулина. В некоторых воплощениях данного изобретения константная область иммуноглобулина включает константные области тяжелой и/или легкой цепей. Константная область тяжелой цепи содержит участки CH1, CH1-CH2 или CH1-CH3. В некоторых воплощениях данного изобретения в константной области

иммуноглобулина имеются одна или более модификаций для придания антителу желаемых свойств. Например указанная константная область может быть модифицирована таким образом, что ослабляются или исчезают одна или более эффекторных функций, или такими образом, что улучшается связывание с рецептором FcRn или вводится один или более остатков цистеина.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые в настоящем документе антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, содержат также конъюгированный с антителом компонент. С антителами по данному изобретению или с их фрагментами, связывающими антиген, могут быть конъюгированы различные агенты (см., например, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr. (eds.), Carger Press, New York, (1989)). Эти конъюгированные компоненты могут быть связаны с антителами или антиген-связывающими фрагментами ковалентной связью, аффинным взаимодействием, путем интеркалирования, координационной связью, путем комплексообразования, ассоциации, смешивания или реакции присоединения. В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые в настоящем документе антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты, в результате генно-инженерных манипуляций содержат специфичные сайты вне тех участков, которые связывают эпитоп; эти сайты можно использовать для связывания с одним или более конъюгируемыми компонентами. Например, такой сайт может включать один или более реакционно способных аминокислотных остатков, например остатков цистеина или гистидина, для облегчения ковалентного связывания с конъюгируемым компонентом. В некоторых воплощениях данного изобретения антитела связаны с конъюгируемым компонентом не напрямую или через другой конъюгируемый компонент. Например, антитела по данному изобретению или их антиген-связывающие фрагменты, могут быть присоединены к биотину, а затем не напрямую соединены со вторым конъюгируемым компонентом, который присоединен к авидину. Конъюгируемым компонентом может быть детектируемая метка, компонент, изменяющий фармакокинетические свойства, компонент, полезный для очистки или цитотоксический компонент. Примеры детектируемых меток включают флуоресцентные метки (например, флуоресцеин, родамин, дансил, фикоэритрин или Texas Red), метки типа фермент-субстрат (например, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, люциферазу, глюкоамилазу, лизоцим, сахаридоксидазу или β -D-галактозидазу), радиоактивные изотопы (например, ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^3H , ^{111}In , ^{112}In , ^{14}C , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{211}At , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi и ^{32}P , другие лантаниды), люминесцентные метки, хромофоры, диоксигенин, биотин/авидин, молекулы ДНК или частицы золота для

детекции. В некоторых воплощениях данного изобретения конъюгируемая часть может представлять собой компонент, изменяющий фармакокинетические свойства, например полиэтиленгликоль (PEG), который способствует увеличению времени полужизни антитела. Пригодные в этом отношении полимеры включают, например, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля и проч. В некоторых воплощениях данного изобретения конъюгируемая часть может представлять собой компонент, нужный для очистки антител, например это могут быть магнитные гранулы. Цитотоксическим компонентом в конъюгате с антителом может быть любой агент, губительный для клеток, который может их повреждать или уничтожать. Примеры цитотоксических компонентов включают (не ограничиваясь перечисленным здесь) таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин-D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пуромицин и их аналогии; антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), алкилирующие агенты (например, меклорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU), ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотоцин, митомицин С, цис-дихлордиамин платина (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (ранее назывался дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин, ранее известный под названием актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС)) и антитуморные агенты (например, винкристин и винбластин).

Полинуклеотиды и генно-инженерные методы

В данном изобретении предлагаются изолированные полинуклеотиды, кодирующие антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты. В некоторых воплощениях данного изобретения изолированные полинуклеотиды содержат одну или более нуклеотидных последовательностей, представленных в таблице 1, которые кодируют участки CDR, представленные в таблице 1.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые изолированные полинуклеотиды кодируют переменную область тяжелой цепи и содержат последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 62 и гомологичных им последовательностей, идентичных по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере на 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%). В некоторых

воплощениях данного изобретения предлагаемые изолированные полинуклеотиды кодируют переменную область легкой цепи и содержат последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 68 и гомологичных им последовательностей, идентичных по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере на 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%). В некоторых воплощениях данного изобретения степень идентичности (в процентах) обусловлена вырожденностью генетического кода, при этом аминокислотная последовательность кодируемого белка не изменяется.

Изолированные полинуклеотиды по данному изобретению, кодирующие антитела против PD-1 и их антиген-связывающие фрагменты (в том числе последовательности, представленные в таблице 1) могут быть встроены в вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии; при этом применяются методы генной инженерии, известные в данной области техники. В другом воплощении данного изобретения указанные антитела получают путем гомологичной рекомбинации, известной в данной области техники. С помощью обычно применяемых в таких случаях методов (например, используя олигонуклеотидные зонды, способные специфично связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител) ДНК, кодирующую моноклональные антитела, нетрудно выделить и определить ее нуклеотидную последовательность. Многие векторы имеются в продаже. В состав вектора, как правило, входят один или более из следующих компонентов (перечисленное здесь не имеет ограничительного характера): сигнальная последовательность, сайт инициации репликации, один или более маркерных генов, энхансер, промотор (например, SV40, CMV, EF-1 α) и последовательность терминации транскрипции.

В некоторых воплощениях данного изобретения используются векторные системы млекопитающих, бактерий, дрожжей и проч., включая такие плазмиды (перечисленное здесь не имеет ограничительного характера), как pALTER, pBAD, pcDNA, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pCMV, pEGFP, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS420, pLexA, pACT2.2 и др., а также иные получаемые в лабораторных условиях или имеющиеся в продаже векторы. Пригодные для целей данного изобретения векторы включают плазмиды или вирусные векторы (например, ретровирусы, дефектные по репликации, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы).

Векторы, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела по данному изобретению или их антиген-связывающие фрагменты, вводят в клетки-

хозяева для клонирования или генной экспрессии. Клетки-хозяева, пригодные для клонирования или экспрессии ДНК в составе векторов по данному изобретению включают клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот, описанные выше. Пригодные для целей данного изобретения прокариотические организмы включают эубактерии, например грамположительные или грамотрицательные, например представителей семейства Enterobacteriaceae, например, *Escherichia*, например *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans* и *Shigella*, а также бациллы, например *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis*, *Pseudomonas* например *P. aeruginosa*, и *Streptomyces*.

Помимо прокариот в качестве клеток-хозяев, пригодных для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела против PD-1 по данному изобретению, можно использовать эукариотические микроорганизмы, например мицелиальные грибы или дрожжи. Из числа низших эукариотических микроорганизмов в роли клеток-хозяев чаще всего используются пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Однако вполне доступны и могут быть использованы по данному изобретению также некоторые другие роды, виды и штаммы организмов, например *Schizosaccharomyces pombe*; представители рода *Kluyveromyces*, например *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans* и *K. marxianus*; представители рода *Yarrowia* (Европейский патент № 402,226); *Pichia pastoris* (Европейский патент № 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (Европейский патент № 244,234); *Neurospora crassa*; представители рода *Schwanniomyces*, например *Schwanniomyces occidentalis*; а также филаментные грибы *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyrocladium* и *Aspergillus*, например *A. nidulans* и *A. niger*.

Клетки-хозяева, пригодные для экспрессии предлагаемых в настоящем документе гликозилированных антител или их антиген-связывающих фрагментов также могут происходить из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Идентифицировано множество штаммов и вариантов бакуловирусов и соответствующие перmissive клетки хозяева насекомых, например гусеницы кукурузной лиственной совки *Spodoptera frugiperda*, комаров *Aedes aegypti* и (*Aedes albopictus*), плодовой мушки *Drosophila melanogaster* и тутового шелкопряда *Bombyx mori*. В продаже имеются различные штаммы вирусов для трансфекции, например вариант L-1 вируса ядерного полиэдрома калифорнийской совки (*Autographa californica NPV*) и штамм Bm-5 вируса ядерного полиэдрома тутового шелкопряда (*Bombyx mori NPV*); такие вирусы можно использовать по данному изобретению, в частности для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*. В качестве клеток-хозяев по

данному изобретению можно использовать также клетки растений, например хлопка, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томатов и табака.

Однако наибольший интерес вызывают клетки позвоночных, и их размножение в культуре (культура ткани) стало обычной процедурой. Примерами линий клеток млекопитающих, которые можно использовать по данному изобретению, являются линия CV1 обезьяньих почечных клеток, трансформированных вирусом SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линии человеческих эмбриональных клеток почки (клетки 293 или 292, субклонированные для культивирования в суспензии; см. Graham F.L. et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); мышинные клетки Сертоли (TM4, Mather J.P., *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); обезьяньи почечные клетки (CV1 ATCC CCL 70); почечные клетки зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HeLa, ATCC CCL 2); собачьи почечные клетки (MDCK, ATCC CCL 34); печеночные клетки серой крысы (BRL 3A, ATCC CRL 1442); легочные клетки человека (W138, ATCC CCL 75); печеночные клетки человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клеточная линия TRI cells (Mather J.P. et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); линия легочных клеток человека MRC 5; линия фибробластов человека FS4; клетки гепатомы человека Hep G2. В некоторых предпочтительных воплощениях данного изобретения в качестве клеток-хозяев используются человеческие эмбриональные почечные клетки линии 293F.

Клетки-хозяева трансформируют описанными выше векторами для клонирования или экспрессии для продуцирования антител против PD-1 и культивируют в обычно используемых питательных средах, модифицированных для индуцирования промоторов, отбора трансформированных клеток или амплификации генов, кодирующих нужные аминокислотные последовательности.

Клетки-хозяева, используемые для продуцирования описанных в настоящем документе антител или их антиген-связывающих фрагментов можно культивировать в различных средах. Для культивирования клеток-хозяев по данному изобретению пригодны такие имеющиеся в продаже среды, как среда Хэма F10 (Sigma), минимальная незаменимая среда Игла (MEM), (Sigma), среда RPMI-1640 (Sigma) и среда Игла, модифицированная по Дульбекко (DMEM), (Sigma). Кроме того, для культивирования клеток-хозяев по данному изобретению можно использовать любую среду из описанных в работах: Ham R. et al., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes D. et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), патенты США № 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655 или 5,122,469;

публикации WO 90/03430; WO 87/00195 или патент США (переизданный) №. 30,985. В любую из указанных культуральных сред можно при необходимости добавлять гормоны и/или другие факторы роста (например, инсулин, трансферрин или фактор роста эпидермиса), соли (например, хлорид или фосфат натрия, кальция или магния), забуферивающие вещества (например, HEPES), нуклеотиды (например, аденозин и тимидин), антибиотики (например, гентамицин), микроэлементы (то есть неорганические вещества, присутствующие в конечной концентрации порядка микромолей) и глюкозу или другой равноценный источник энергии. Специалистам в данной области техники известны и другие нужные добавки, которые включают в состав среды в подходящей для того или иного случая концентрации. Условия культивирования, например температура, pH и др., берут такие, какие ранее использовались применительно к выбранным для экспрессии клеткам-хозяевам, что должно быть очевидно для специалиста в данной области техники.

Образовавшиеся в клетке-хозяине рекомбинантные антитела могут находиться внутри клетки или в периплазматическом пространстве либо секретироваться в культуральную среду. Если продуцируемые антитела остаются внутри клетки, то для начала клетки подвергают лизису и удаляют клеточные обломки путем центрифугирования или ультрафильтрации. В работе Carter M.J. et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) описывается выделение антител, продуцируемых клетками *E. coli* и секретированных в периплазматическое пространство. Вкратце процедура выделения состоит в следующем. Суспензию клеток оттаивают в присутствии ацетата натрия (pH 3.5), EDTA и фенолметилсульфонилфторида (PMSF) в течение около 30 минут. Затем клеточные обломки удаляют путем центрифугирования. Когда продуцируемые клетками-хозяевами антитела секретированы в культуральную среду, то супернатант после отделения клеток вначале концентрируют с помощью имеющихся в продаже концентрирующих фильтров для белков, например Amicon, или с помощью ультрафильтрационных кассет Pellicon (Millipore). На любой из предыдущих стадий выделения можно использовать ингибиторы протеаз, например PMSF, для подавления протеолиза и антибиотики для предотвращения размножения посторонних микроорганизмов.

Полученные из клеток антитела подвергают очистке путем, например, хроматографии с использованием гидроксилпатита, гель-электрофореза, диализа, ионообменной хроматографии с использованием диэтиламиноэтилцеллюлозы, осаждения сульфатом аммония, высаливания и аффинной хроматографии, причем предпочтительным методом очистки является аффинная хроматография. В зависимости от разновидности

антитела и изотипа его константного домена Fc для очистки можно использовать протеин А в качестве аффинного лиганда. Протеин А пригоден в случае очистки антител на основе человеческих тяжелых цепей $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ (см. Lindmark R. et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). В случае мышинных изотипов (всех) и человеческого изотипа $\gamma 3$ рекомендуется протеин G (Guss V. et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). Матрицей для прикрепления аффинного лиганда служит чаще всего агароза, но используют и другие материалы. Механически стабильные матрицы, например пористое стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол, обеспечивают большую скорость потока и меньшее время прогона по сравнению с агарозой. Если антитела содержат домен СН3, то для очистки полезна смола Bakerbond ABX.TM. (J. T. Baker, Филипсбург, шт. Нью-Джерси, США). В зависимости от специфики подлежащих очистке антител можно применять другие методы очистки белков, например фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этиловым спиртом, высокоэффективную жидкостную хроматографию на обращенной фазе, хроматографию с использованием силикагеля, гепарин-сефарозы, анионо- или катионообменных смол (например, полиаспартата), хроматофокусирование, электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) и осаждение сульфатом аммония.

При очистке антител после каких-либо предварительных этапов смесь, содержащую нужные антитела и примеси подвергают гидрофобной хроматографии при низких рН, используя для элюирования буферный раствор с рН около 2,5-4,5, предпочтительно при низкой концентрации солей (например, при концентрации соли около 0-0,25 М).

Наборы

В настоящем описании предлагаются наборы, содержащие антитела против PD-1 по данному изобретению или их антиген-связывающие фрагменты. В некоторых воплощениях данного изобретения такой набор используется для выявления присутствия или определения уровня PD-1 в биологическом образце. Биологический образец, анализируемый при этом, может содержать клетки или ткань.

В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемый набор содержит антитела против PD-1 или их антиген-связывающие фрагменты, в составе конъюгата с детектируемой меткой. В некоторых других воплощениях данного изобретения предлагаемый набор содержит немеченые антитела против PD-1 или их антиген-связывающие фрагменты, а также содержит вторые меченые антитела, способные связываться с немечеными антителами против PD-1. Такой набор может также содержать инструкцию по применению, а компоненты набора упакованы по отдельности.

В некоторых воплощениях данного изобретения антитела против PD-1 или их антиген-связывающие фрагменты, ассоциированы с субстратом или устройством, используемым при ELISA типа «сэндвич» или при иммунографическом тесте. Указанным субстратом или устройством может быть микротитровальный планшет или тест-полоска.

Фармацевтические композиции и способ лечения

В настоящем описании также предлагаются фармацевтические композиции, содержащие антитела против PD-1 по данному изобретению или их антиген-связывающие фрагменты и один или более фармацевтически приемлемых носителей.

Фармацевтически приемлемые носители для применения в фармацевтических композициях по данному изобретению включают, например, фармацевтически приемлемые жидкости, гели или твердые носители, водные несущие среды, неводные несущие среды, противомикробные агенты, агенты, обеспечивающие нужное осмотическое давление, забуферивающие агенты, антиоксиданты, анестезирующие вещества, суспендирующие агенты, комплексообразующие или хелатирующие агенты, разбавители, вспомогательные или дополнительные нетоксичные компоненты и другие эксципиенты, известные в данной области техники, или их комбинации.

Компоненты, пригодные для композиций по данному изобретению, включают, например, антиоксиданты, наполнители, связующие агенты, дезинтегрирующие агенты, забуферивающие агенты, консерванты, агенты, улучшающие скольжение, ароматизаторы, загустители, красители, эмульгирующие агенты или стабилизирующие агенты, например сахара или циклодекстрины. Антиоксиданты, пригодные для композиций по данному изобретению, включают, например, метионин, аскорбиновую кислоту, этилендиаминтетраацетат (EDTA), тиосульфат натрия, платину, каталазу, лимонную кислоту, цистеин, тиоглицерол, тиогликолевую кислоту, тиосорбит, бутилгидроксианизол, бутилгидрокситолуол и/или пропилгаллат. В настоящем документе описывается, что если в состав композиции, содержащей антитела по данному изобретению или их антиген-связывающие фрагменты, и конъюгаты, входит один или более антиоксидантов, например метионин, ослабляется окисление указанных антител и их фрагментов. Это ослабление окисления предотвращает или снижает потерю аффинности связывания, тем самым повышая стабильность антител и увеличивая их срок хранения. Таким образом, в некоторых воплощениях данного изобретения предлагаются композиции, содержащие одно или более описанных в настоящем документе антител или их антиген-связывающих фрагментов и один или более антиоксидантов, например метионин. Также в настоящем документе предлагаются способы предотвращения окисления, продления срока хранения и/или повышения эффективности антител по данному изобретению или их антиген-

связывающих фрагментов путем смешивания указанных антител или их антиген-связывающих фрагментов с одним или более антиоксидантом, например метионином.

Также фармацевтически приемлемые носители включают, например, водные несущие среды, например раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инфузий, изотонический раствор декстрозы для инъекций/инфузий, стерильную воду для инъекций, раствор Рингера с декстрозой для инфузий, раствор Рингера лактатный для инфузий; неводные несущие среды, например нелетучие масла растительного происхождения, масло из семян хлопка, кукурузное масло, кунжутное масло или арахисовое масло; противомикробные агенты в бактериостатических или фунгистатических концентрациях; агенты, обеспечивающие желаемое осмотическое давление, например хлорид натрия или декстроза; забуферивающие агенты, например фосфатные или цитратные буферные растворы; антиоксиданты, например бисульфат натрия; местные обезболивающие агенты, например прокаина гидрохлорид; суспендирующие и диспергирующие агенты, например карбоксиметилцеллюлоза натрия, гидроксипропилметилцеллюлоза или поливинилпирролидон; эмульгирующие агенты, например полисорбат-80 (TWEEN-80); комплексообразующие или хелатирующие агенты, например этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) или этиленгликольтетрауксусная кислота (EGTA); этиловый спирт; полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль; гидроксид натрия, соляная кислота, лимонная кислота или молочная кислота. Фармацевтическая композиция может быть дополнена противомикробным агентом, используемым в качестве несущей среды, при помощи упаковки для многократного приема, содержащей фенолы или крезолы, соединения ртути, бензиловый спирт, хлорбутанол, метиловый и пропиловый эфиры пара-гидроксibenзойной кислоты, тимеросал, бензалкония хлорид и бензетония хлорид. Пригодные по данному изобретению эксципиенты включают, например воду, солевой (физиологический) раствор, декстрозу, глицерин или этиловый спирт. Пригодные по данному изобретению нетоксичные вспомогательные вещества включают, например, смачивающие или эмульгирующие агенты, забуферивающие вещества, стабилизирующие агенты, агенты, повышающие растворимость, или такие агенты, как уксуснокислый натрий, сорбитан монолаурат, триэтаноламина олеат или циклодекстрин.

Фармацевтические композиции по данному изобретению могут быть представлены жидким раствором, суспензией, эмульсией, пилюлями, капсулами, таблетками, препаратом с замедленным высвобождением или порошком. Препараты для перорального применения включают обычно применяемые в таких составах носители, например маннит, лактозу, крахмал, магния стеарат, поливинилпирролидон, сахарин (сахаринат

натрия), целлюлозу, карбонат магния и др. (все перечисленные вещества фармацевтической степени чистоты).

В воплощениях данного изобретения предлагаемые композиции имеют состав, пригодный для введения путем инъекций. Фармацевтические композиции по данному изобретению для введения путем инъекций могут быть получены в виде любой из обычных для данного способа введения форм, например в виде жидкого раствора, суспензии, эмульсии или в твердом виде, пригодном для изготовления жидкого раствора, суспензии или эмульсии. Препараты для инъекций включают стерильные и/или апиrogenные растворы, готовые для введения путем инъекции, стерильные сухие растворимые продукты, например лиофилизованные порошки, готовые для объединения с растворителем непосредственно перед введением, а также таблетки для имплантации под кожу, стерильные суспензии, готовые для введения путем инъекции, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые для объединения с несущей средой непосредственно перед введением, и стерильные и/или апиrogenные эмульсии. Указанные растворы могут быть водными либо не водными.

В некоторых воплощениях данного изобретения препараты для парентерального введения расфасованы как стандартные разовые дозы в ампулах, флаконах или шприцах с иглой. Все препараты для парентерального введения должны быть стерильными и апиrogenными, как это известно и принято в данной области техники.

В некоторых воплощениях данного изобретения для приготовления композиции антител в виде стерильного лиофилизованного порошка описанные в настоящем документе антитела или их антиген-связывающие фрагменты, растворяют в подходящем растворителе. Этот растворитель может содержать эксципиенты, способствующие стабильности препарата, или другие фармакологические компоненты порошка или получаемого из него раствора. При этом могут использоваться следующие эксципиенты (перечисленное здесь не имеет ограничительного характера): вода, декстроза, сорбит, фруктоза, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкоза, сахароза и другие пригодные в данном случае агенты. Указанный растворитель может содержать забуферивающие компоненты, например цитрат, фосфат натрия или калия или иные забуферивающие вещества, известные специалистам в данной области техники; в одном из воплощений данного изобретения забуферивающие агенты поддерживают нейтральный pH. После растворения компонентов полученный раствор подвергают фильтрации в стерильных условиях и затем лиофилируют в стандартных условиях, известных специалистам в данной области техники; в результате получается желаемый препарат. В одном из воплощений данного изобретения указанный раствор перед лиофилизацией

расфасовывают по флаконам. Каждый флакон содержит разовую дозу или несколько доз антител против PD-1 по данному изобретению или их фрагментов, связывающих антигене, или композиции, включающей эти антитела или фрагменты. Чтобы облегчить набор из флакона точного количества препарата и тем самым обеспечить точность дозирования, приемлемо помещать в каждый флакон количество препарата, немного превышающее разовую дозу или несколько доз (например, на около 10%). Лиофилизированный порошок хранят в подходящих для него условиях, например при температуре от около 4°C до комнатной температуры.

Путем разведения указанного лиофилизованного порошка водой для инъекций получают жидкий препарат для парентерального введения. В одном из воплощений данного изобретения для разведения лиофилизованного порошка к нему добавляют стерильную и/или апиrogenную воду или другие пригодные в данном случае жидкие носители. Конкретное количество добавляемой жидкости зависит от проводимой терапии; его можно определить эмпирически.

В настоящем описании предлагаются также терапевтические методы, включая введение терапевтически эффективного количества антитела по данному изобретению или его антиген-связывающего фрагмента нуждающемуся в том индивиду, и таким образом производится лечение или предотвращение расстройства или состояния, связанного с белком PD-1. В другом аспекте данного изобретения предлагается способ лечения состояния, при котором благотворно усиление иммунного ответа, причем этот способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела по данному изобретению или его антиген-связывающего фрагмента нуждающемуся в том индивиду.

Терапевтически эффективное количество антитела по данному изобретению или его антиген-связывающего фрагмента зависит от различных факторов, известных в данной области техники, например массы тела индивида, его возраста, анамнеза, принимаемых лекарственных препаратов, общего состояния здоровья, а также вероятности перекрестных реакций, аллергических процессов, чувствительности, негативных побочных эффектов, пути введения препарата и степени развития опухоли. В соответствии с указанными факторами и другими обстоятельствами или требованиями дозировка может быть в индивидуальном порядке изменена (увеличена или уменьшена) рядовым специалистом в данной области техники (например, врачом или ветеринаром).

В некоторых воплощениях данного изобретения описанные в настоящем документе антитела или их антиген-связывающие фрагменты, вводят в терапевтически эффективной дозировке от около 0,01 мг на 1 кг массы тела индивида до около 100 мг/кг (например, около 0,01 мг/кг, около 0,5 мг/кг, около 1 мг/кг, около 2 мг/кг, около 5 мг/кг,

около 10 мг/кг, около 15 мг/кг, около 20 мг/кг, около 25 мг/кг, около 30 мг/кг, около 35 мг/кг, около 40 мг/кг, около 45 мг/кг, около 50 мг/кг, около 55 мг/кг, около 60 мг/кг, около 65 мг/кг, около 70 мг/кг, около 75 мг/кг, около 80 мг/кг, около 85 мг/кг, около 90 мг/кг, около 95 мг/кг или около 100 мг/кг. В некоторых воплощениях данного изобретения описанные в настоящем документе антитела или их антиген-связывающие фрагменты, вводят в терапевтически эффективной дозировке около 50 мг/кг или меньше, и в некоторых воплощениях данного изобретения дозировка составляет 10 мг/кг или меньше, 5 мг/кг или меньше, 1 мг/кг или меньше, 0,5 мг/кг или меньше или 0,1 мг/кг или меньше. В некоторых воплощениях данного изобретения дозировка может изменяться в ходе лечения. Например, в некоторых воплощениях данного изобретения первоначальная дозировка может быть выше, чем при последующих введениях. В некоторых воплощениях данного изобретения дозировка варьирует в ходе лечения в зависимости от реакции пациента.

Режим дозирования подбирают так, чтобы обеспечить оптимальную ответную реакцию у индивида (например, терапевтический ответ). Например, препарат вводят однократно или же в несколько приемов на протяжении какого-то промежутка времени.

Описанные в настоящем документе антитела или их антиген-связывающие фрагменты, можно вводить индивиду любым путем, известным в данной области техники например, парентерально (например, путем подкожной, внутрибрюшинной, внутривенной инъекции, включая внутривенную инфузию, путем внутримышечной или внутрикожной инъекции) либо энтерально (например, перорально, внутриглазнично, подъязычно, ректально или местно).

Состояния и расстройства, ассоциированные с белком PD-1, могут быть заболеваниями или расстройствами, связанными с иммунитетом. В некоторых воплощениях данного изобретения состояния и расстройства, ассоциированные с белком PD-1, включают опухолевые и раковые заболевания, например немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, почечноклеточный рак, колоректальный рак, рак яичника, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, карциному желудка, рак мочевого пузыря, рак пищевода, мезотелиому, меланому, рак головы и шеи, рак щитовидной железы, саркому, рак предстательной железы, глиобластому, рак шейки матки, карциному вилочковой железы, лейкозы, лимфомы, миеломы, грибовидный микоз, рак из клеток Меркеля и иные злокачественные гематологические состояния, например классическая лимфома Ходжкина (CHL), первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома, Т-клеточная/богатая гистиоцитами В-клеточная лимфома, посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство (PTLD) при наличии

вируса Эпштейна-Барр (EBV) и в его отсутствии, диффузная В-крупноклеточная лимфома, ассоциированная с вирусом Эпштейна-Барр (DLBCL), плазмобластная лимфома, внеузелковая НК-клеточная/Т-клеточная лимфома, назофарингеальная карцинома, первичная эффузионная лимфома, ассоциированная с вирусом герпеса человека 8 (HHV8), лимфома Ходжкина, новообразования центральной нервной системы (например, первичная лимфома центральной нервной системы, опухоли позвоночника, глиому ствола мозга. В некоторых воплощениях данного изобретения опухоли и раковые заболевания являются метастазирующими, в частности метастазирующими опухолями, в которых экспрессируется PD-L1. В некоторых воплощениях данного изобретения состояния и расстройства, ассоциированные с белком PD-1, включают аутоиммунные заболевания, например, системную красную волчанку, псориаз, системную склеродермию, аутоиммунный диабет и др. . В некоторых воплощениях данного изобретения состояния и расстройства, ассоциированные с белком PD-1, включают инфекционные заболевания, например хронические вирусные инфекции, например, инфекцию вирусом гепатита В, инфекцию вирусом гепатита С, герпесвирусные инфекции, инфекции вирусом Эпштейна-Барр, цитомегаловирусом, вирусом иммунодефицита человека, вирусом простого герпеса типа I, вирусом простого герпеса типа II, папилломавирусом человека, аденовирусами, эпидемического варианта вируса герпеса, ассоциированного с саркомой Капоши, вируса гепатита ТТ (вируса «тонкого ожерелья», или вируса Torque Teno), полиомавирусов JC или BK.

Способы применения

В настоящем описании предлагаются способы применения антител против PD-1 или их фрагментов, связывающих антиген.

В некоторых воплощениях данного изобретения настоящим описанием предлагаются способы лечения состояний или расстройств, ассоциированных с белком PD-1, у нуждающегося в том индивида, включающие введение индивиду терапевтически эффективного количества антител против PD-1 или их фрагментов, связывающих антиген. В некоторых воплощениях данного изобретения указанный индивид определяется как страдающий состоянием или расстройством, которое скорее всего чувствительно к антагонистам PD-1.

Наличие или уровень лиганда белка PD1 (PD--L1) в анализируемом биологическом образце может служить указанием на то, будет ли у индивида, у которого взят данный образец, реакция на антагонист PD-1. Для определения наличия или уровня PD-L1 во взятом у пациента биологическом образце используются различные методы. Например, если при контактировании биологического образца с антителами против PD-L1 или их

фрагментами, связывающими антиген, имеет место связывание этих антител или антительных фрагментов с PD-L1, то, значит, в образце экспрессируется этот белок. Или же PD-L1 можно выявить, определяя в образце уровень соответствующего полинуклеотида с помощью таких методов, как полимеразная цепная реакция в реальном времени (qPCR), полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (rtPCR), микрочипы, SAGE, FISH и др. В некоторых воплощениях данного изобретения биологический образец берут из раковых клеток или ткани, или из клеток иммунной системы, инфильтрирующих опухоль. В некоторых воплощениях данного изобретения присутствие или повышенный уровень PD-L1 в биологическом образце является указанием на вероятность ответной реакции у индивида на антитела по данному изобретению. Термин «повышенный уровень» в настоящем документе относится к суммарному возрастанию не менее чем на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% или больше уровня белка PD-L1 в образце при определении с использованием предлагаемых в настоящем документе антител или их антиген-связывающих фрагментов по сравнению с уровнем белка PD-L1 в референсном образце при определении с использованием тех же антител. Референсным образцом может быть контрольный образец, взятый у здорового или не страдающего данным заболеванием индивида, или же взятый у того же индивида, которого диагностируют, но из нормальных клеток или тканей. Например, референсным образцом может служить образец не затронутых данным заболеванием клеток или тканей, соседних с клетками или тканями, из которых взят анализируемый образец (например, из опухоли) или расположенных вблизи от этого места.

Описанные в настоящем документе антитела или антиген-связывающие фрагменты, вводят индивиду сами по себе или в сочетании с одним или более дополнительных терапевтических агентов или средств. Например, описанные в настоящем документе антитела или антиген-связывающие фрагменты можно вводить в сочетании с химиотерапией, лучевой терапией, хирургическим вмешательством (например, tumorэктомией), применением одного или более противорвотных средств или с другими лечебными мероприятиями, предпринимаемыми для борьбы с побочными эффектами химиотерапии, или в сочетании с любыми другими терапевтическими агентами, используемыми при лечении раковых заболеваний или любых расстройств, в которых участвует белок PD-1. В некоторых из этих воплощений описанные в настоящем документе антитела или антиген-связывающие фрагменты, при сочетании их с одним или более дополнительными терапевтическими агентами вводят пациенту одновременно с этими дополнительными терапевтическими агентами, а в некоторых из этих воплощений

описанные в настоящем документе антитела или антиген-связывающие фрагменты и дополнительные терапевтические агенты вводят в составе одной и той же фармацевтической композиции. Однако при комбинированной терапии с использованием антител и антиген-связывающих фрагментов по данному изобретению их не обязательно вводить пациенту одновременно с дополнительными терапевтическими агентами или в составе одной и той же композиции. Выражение «в сочетании» в настоящем документе подразумевает также, что антитела антиген-связывающие фрагменты по данному изобретению могут быть введены пациенту до или после применения других лечебных средств, в том числе даже если указанные антитела или антиген-связывающие фрагменты вводят в организм одним путем, а второй (один или более) терапевтический агент – другим. По возможности дополнительный терапевтический агент, применяемый в сочетании с антителами или антиген-связывающими фрагментами, описанными в настоящем документе, вводят пациенту так, как указано в сопровождающем этот фармацевтический продукт информационном листке или согласно Настольному справочнику врача (Physicians' Desk Reference, 57th Ed; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002)) или по известным в данной области техники протоколам использования данного дополнительного терапевтического агента.

В некоторых воплощениях данного изобретения дополнительные терапевтические агенты вызывают или усиливают противораковый иммунный ответ. Например, для того, чтобы индуцировать иммунный ответ, направленный против определенной опухоли или ракового заболевания, можно использовать противоопухолевую вакцину. Для усиления процесса представления опухолевых антигенов иммунной системе также применяется цитокиновая терапия. Примеры используемых при этом цитокинов включают (не ограничиваясь перечисленным здесь) интерфероны (например α -, β - и γ - интерферон), колониестимулирующие факторы (например, M-CSF - колониестимулирующий фактор макрофагов, G-CSF колониестимулирующий фактор гранулоцитов, GM-CSF - колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов), интерлейкины (например, IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11 и IL-12), факторы некроза опухолей (например, TNF- α и TNF- β). Можно также использовать агенты, инактивирующие факторы иммуносупрессии, например ингибиторы трансформирующего фактора роста «бета» (TGF- β), ингибиторы интерлейкина-10 и ингибиторы Fas-лиганда. Другую группу дополнительных терапевтических агентов составляют те, которые активируют противоопухолевый или противораковый иммунный ответ, например факторы, усиливающие активацию Т-лимфоцитов (например, агонисты Т-клеточных костимулирующих молекул, например CTLA-4, ICOS и OX-40), а также факторов,

усиливающих функции дендритных клеток и представление антигена.

Приведенные ниже примеры представлены с целью наилучшим образом иллюстрировать заявленное изобретение, и их не следует считать ограничивающими его объем. Все конкретные композиции, материалы и способы, описанные в этих примерах, в целом или частично охватываются объемом данного изобретения. Эти конкретные композиции, материалы и способы не ограничивают объем данного изобретения, а лишь иллюстрируют конкретные воплощения изобретения, входящие в его объем. Специалист в данной области техники вполне может разработать равноценные композиции, материалы и способы, не нарушая признаки изобретения и не отступая от его объема. Ясно, что возможно множество вариаций описанных в настоящем документе процедур, не выходящих за границы данного изобретения. Авторы данного изобретения полагают такие вариации входящими в его объем.

Пример 1. Получение антител с помощью гибридом

1.1. Получение иммуногена. Синтезировали ДНК, кодирующую белок PD-1 и внеклеточный домен лиганда PD-L1 (PD-L1 ECD) или полноразмерный PD-L1, и встраивали ее в экспрессионный вектор pDNA3.3. ДНК выделяли при помощи набора Maxiprep и проводили проверку последовательности встроенной ДНК путем секвенирования. Для того, чтобы получить слитые белки PD-1 ECD и PD-L1 ECD, содержащие различные метки, в том числе человеческий Fc, мышиный Fc и гистициновую метку, проводили трансфекцию гена человеческого PD-1 ECD в клетки CHO-S или HEK293. Через пять суток собирали супернатанты культур временно трансфицированных клеток и выделяли из них искомые белки. Слитые белки очищали и характеризовали количественно для использования при иммунизации и скрининге.

1.2. Получение стабильных линий клеток. Чтобы получить инструмент для скрининга и проверки антител были получены линии клеток, трансфицированных генами PD-1 и PD-L1. Говоря коротко, проделывали следующее: клетки CHO-K1, 293F или Ba/F3 трансфицировали экспрессионным вектором pCND3.3, содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие полноразмерный PD-1 или PD-L1, используя набор для трансфекции с липофектаминол Lipofectamine 2000 Transfection kit согласно протоколу, предложенному производителем. Через 48-72 часов после трансфекции трансфицированные клетки культивировали в среде, содержащей бластицидин или генетицин (G418) для отбора клеток. Через некоторое время отбирали клетки со стабильно включенными в геном генами PD-1 или PD-L1. Проверляли экспрессию в клетках генов PD-1 и PD-L1. После того как экспрессия подтвердилась отбирали представляющие интерес одиночные клоны методом предельного разведения и затем культивировали в

большом объеме. Полученные моноклональные клеточные линии поддерживали в среде, содержащей в низких концентрациях бластицидин и G418.

1.3. Получение гибридом.

1.3.1. Иммунизация и слияние клеток. Крыс ОМТ (Open Monoclonal Technology, Inc., Пало-Альто, США) возрастом 8-10 недель иммунизировали, вводя им в подушечку лапы 10 мкг человеческого PD-1 ECD, применяя при первом введении адъювант TiterMax и затем повторяя введение PD-1 ECD каждые три дня с адъювантом, содержащим алюминий. Раз в две недели у крыс брали кровь для сбора сыворотки и определяли титры антител путем ELISA или FACS. Когда титр антител становился достаточно высоким, крысам вводили последнюю дозу иммуногена без адъюванта, вместо которого вводили физиологический раствор, забуференный фосфатом (100 мкл 1XPBS), и затем проводили слияние клеток следующим образом: из лимфатических узлов иммунизированных ОМТ крыс выделяли В-лимфоциты и объединяли их с миеломными клетками (в соотношении 1:1). Смесь клеток промывали и суспендировали в 5-10 мл раствора для электростимулируемого слияния (ECF). Добавляли тот же раствор до концентрации клеток 2×10^6 /мл. Сразу после осуществления электростимулируемого слияния клеток клеточную суспензию из ячейки переносили в стерильную пробирку, содержащую больший объем среды. Инкубировали не менее 24 часов при температуре 37°C, после чего клеточную суспензию перемешивали и пипеткой вносили в лунки 96-луночного планшета ($0,5 \times 10^6$ клеток на планшет). Клетки инкубировали при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Когда клоны становились достаточно большими, брали по 100 мкл супернатанта из лунок для проведения скрининга антител.

1.3.2 Первый скрининг и подтверждающее тестирование супернатантов культур гибридом. Первый скрининг гибридомных супернатантов на связывание с белком PD-1 проводили методом ELISA. Вкратце проделывали следующее: планшеты (Nunc) покрывали растворимым белком – внеклеточным доменом PD-1 в концентрации 1 мкг/мл и оставляли на ночь при температуре 4°C. После блокирования и промывки на покрытый планшет наносили гибридомные супернатанты и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После этого планшеты промывали и инкубировали со вторичными антителами – козьими антителами против крысиного иммуноглобулина IgG1, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP; Bethyl), и с козьими антителами против крысиного иммуноглобулина IgG2b, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP; Bethyl) в течение 45 минут. Промывали и добавляли субстрат - TMB; реакцию останавливали добавлением соляной кислоты (2M). Определяли поглощение на длине волны 450 нм с помощью микропланшетного ридера (Molecular Device). Нативное

связывания антител против PD-1 с молекулами PD-1 на клеточной мембране, определяли путем FACS применительно к клеткам линии CHO-S, трансфицированным PD-1. Клетки CHO-S, в которых экспрессировался человеческий PD-1, переносили на 96-луночный планшет с U-образным дном (BD) в концентрации 1×10^6 клеток/мл. Затем наносили на планшеты гибридные супернатанты и инкубировали в течение 1 часа при температуре 4°C . Промывали планшеты (1XPBS, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA)) и добавляли вторичные антитела – козы антитела против крысиного IgG, конъюгированные с FITC (Jackson Immunoresearch Lab.); инкубировали в темноте при температуре 4°C в течение 1 часа. Клетки промывали, ресуспендировали в 1XPBS/1%BSA или фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра (BD). Антитела, связывающиеся с исходными клетками CHO-S анализировали так же. Фиг. 1 иллюстрирует связывание антител против человеческого PD-1, с клетками CHO, в которых экспрессировался PD-1. Клетки CHO, трансфицированные полноразмерным человеческим PD-1, окрашивали антителами против человеческого PD-1 из крысиных гибридом, затем окрашивали вторичными антителами - конъюгированными с FITC козыми антителами против Fc крысиного IgG Fc и анализировали путем FACS. Полученные данные показали, что проверяемые антитела специфично связываются с PD-1, экспрессирующимся в клетках CHO.

Для проверки аффинности связывания испытываемых антител с нативным PD-1, экспрессирующимся в человеческих (CD4+)Т-лимфоцитах, получали человеческие (CD4+)Т-лимфоциты из PBMC, которые культивировали в течение трех суток с IL-2 и ОКТ3, после чего обрабатывали антителами против человеческого PD-1. Связывание антител против PD-1 с Т-лимфоцитами анализировали путем FACS. Как видно на фиг. 3, этот анализ показал, что испытываемые антитела специфично связываются с нативным PD-1, экспрессирующимся в (CD4+)Т-лимфоцитах.

Для подтверждения отбора нужных антител проверяли их блокирующую активность. Методом FACS определяли способность отобранных антител блокировать связывание лиганда PD-1 (PD-L1) с белком PD-трансфицированных клеток CHO-S. Клетки CHO-S, в которых экспрессировался человеческий PD-1, наносили на 96-луночный планшет с U-образным дном (BD) в концентрации 1×10^6 клеток в 1 мл. Готовили серийные разведения антител в буферном растворе для промывания (1XPBS/1%BSA) и инкубировали их с указанными клетками при температуре 4°C в течение 1 часа. Промывали, добавляли слитый белок человеческий Fc-человеческий PD-L1 и инкубировали при температуре 4°C в течение 1 часа. После этого с этими клетками инкубировали (в темноте при температуре 4°C в течение 1 часа) вторичные антитела –

козы антитела против Fc человеческого IgG Fc, конъюгированные с FITC (перекрестная реактивность к Fc крысиного IgG отсутствовала; Jackson Immunoresearch Lab). Затем клетки промывали и ресуспендировали в буферном растворе для промывания (1XPBS/1%BSA) или фиксировали 4%-ным параформальдегидом, после чего анализировали путем проточной цитометрии.

1.3.3. Субклонирование гибридом. Когда были проверены в первом скрининге и в подтверждающем тесте специфичное связывание и блокирующая активность изучаемых антител, линии гибридом, давших положительный ответ, использовали для субклонирования. Коротко говоря, проделывали следующее: для каждой гибридомной линии проводили подсчет клеток и разводили их средой для клонирования до концентрации 5 клеток на 1 лунку, 1 клетка на 1 лунку и 0,5 клеток на 1 лунку. Высеивали эти разведения на 96-луночные планшеты в количестве 200 мкл на 1 лунку, так что в одном планшете в каждой лунке находилось 5 клеток, в другом – 1 клетка и в четырех планшетах – по 0,5 клеток. Планшеты помещали в инкубатор с атмосферой, содержащей 5% CO₂ при температуре 37°C и инкубировали до тех пор, пока все клеточные линии не размножились достаточно, чтобы провести ELISA.

Пример 2. Аминокислотная последовательность антител из гибридом и характеристика полностью человеческих антител.

2.1. Аминокислотная последовательность антител из гибридом. Из моноклональных гибридом выделяли РНК с помощью реагента TRIzol. Нуклеотидные последовательности, соответствующие вариабельным областям тяжелых (VH) и легких цепей (VL) антител против PD-1 амплифицировали согласно следующему протоколу (изложенному вкратце): вначале с РНК с помощью обратной транскриптазы синтезировали кДНК, используя следующую реакционную систему (20 мкл):

10×RT буфер	2.0μl
25× смесь dNTP (100 mM)	0,8 мкл
10× случайные праймеры/oligodT /специфичный праймер	2,0 мкл
Обратная траскриптаза MultiScribe™	1,0 мкл
Ингибитор РНКазы	1,0 мкл
РНК	2 мкг
Вода (безнуклеазная)	до 20,0 мкл

Условия реакции

	Стадия 1	Стадия 2	Стадия 3	Стадия 4
Температура	25	37	85	4
Время	10 мин	120 мин	5 мин	∞

Полученную в результате кДНК использовали в качестве матрицы для последующей ПЦР амплификации, используя праймеры, специфичные для нужных генов.

ПЦР проводили следующим образом.

кДНК	1 мкл
Буфер для Ex ПЦР	5 мкл
dNTP	2 мкл
ExTaq	0,5 мкл
P1 (25 пМ)	0,5 мкл
P2 (25 пМ)	0,5 мкл
Вода стерильная ультрачистая	40,5 мкл

Условия реакции

94°C 3 мин	} 30 циклов
94°C 30 с	
60°C 30 с	
72°C 1 мин	
72°C 10 мин	

10 мкл смеси ПЦР реакции использовали для лигирования с вектором pMD18-T. Трансформировали продуктами лигирования (10 мкл) компетентные клетки *E. coli* (штамм Top10), переносили смесь на предварительно нагретые планшеты (2-YT+Cab) согласно стандартному протоколу и инкубировали в течение ночи. Положительные клоны проверяли путем PCR, используя праймеры M13-48 и M13-47, после чего проводили секвенирование.

2.2. Конструирование полностью человеческих антител. Нуклеотидные последовательности, соответствующие переменным областям тяжелых (VH) и легких цепей (VL) антител против PD-1 амплифицировали, как описано выше. Реакционные смеси очищали с помощью набора PCR Clean-Up Kit и нуклеотидную последовательность для переменной области легкой цепи (VL) и вектор pCI расщепляли ферментами рестрикции Pme I и BssH II при температуре 37°C в течение 2 часов. Проводили электрофорез в 1%-ном агарозном геле и выделяли ДНК из гелей с помощью соответствующего набора согласно инструкциям производителя. Проводили лигирование расщепленных VL и pCI следующим образом.

Компонент	Количество
Вектор pCI	80 нг
Фрагменты VL (инсерция)	100 нг
Буферный раствор для ДНК-лигаза фага T4	1 мкл
ДНК-лигаза фага T4	0,5 мкл
Вода стерильная ультрачистая	До 10 мкл

Смесь инкубировали при температуре 16°C в течение 30 минут. Реакционную смесь в количестве 10 мкл использовали для трансформации и роста клонов. Для выделения плазмидной (pCI-VL) ДНК использовали клоны, получившие подтверждение при описанной выше проверке. Затем вектор pCI-VL и нуклеотидную последовательность для фрагмента VH расщепляли рестриктазами XbaI и Sal I, очищали расщепленные нуклеотидную последовательность для VH и вектор и проводили лигирование с помощью ДНК-лигазы фага T4 в течение 30 минут при температуре 16°C. Проверяли последовательности встроенных полинуклеотидов для VL и VH путем секвенирования, после чего использовали экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидные последовательности для полноразмерного IgG полностью человеческого антитела против PD-1 для временной трансфекции и получения стабильных клеточных линий..

Пример 3. Характеристика полностью человеческих антител

3.1. Определение аффинности связывания антител против PD-1 с молекулами PD-1 на клеточной поверхности методом проточной цитометрии (FACS). Аффинность связывания изучаемых антител с PD-1 клеточной поверхности проводили путем анализа FACS. Клетки CHO-S, в которых экспрессировался человеческий PD-1, вносили в луны 96-луночных планшетов с U-образным дном (BD) в концентрации 5×10^5 клеток/мл. Готовили серийные разведения 1:2 испытываемых антител в буферном растворе для промывания (1XPBS/ 1%BSA) и инкубировали их с указанными клетками при температуре 4°C в течение 1 часа. Затем добавляли вторичные антитела – козы антитела против Fc человеческого IgG, конъюгированные с FITC (3,0 моля FITC на 1 моль IgG; Jackson Immunoresearch Lab) и инкубировали в темноте при температуре 4°C в течение 1 часа. После этого клетки промывали один раз, ресуспендировали в растворе 1XPBS/1%BSA и анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии (BD). Интенсивность флуоресценции пересчитывали как количество связанных молекул на одну клетку, используя наборы с калибровочными частицами Quantum™ MESF Kits (Bangs Laboratories, Inc.). KD рассчитывали с помощью программы Graphpad Prism5. Фиг. 2

иллюстрирует связывание полностью человеческих антител против PD-1 (то есть антител 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.139.15 hAb и 1.153.7 hAb) с клетками CHO, в которых экспрессируется PD-1. Полностью человеческие антитела против человеческого PD-1 использовали для окрашивания клеток CHO, трансфицированных PD-1, и анализ FACS показал, что полностью человеческие антитела против PD-1 специфично связываются с PD-1, причем это связывание характеризуется EC_{50} около 2 нмоль/л.

Антитела 1.103.11-v2 hAb были получены путем мутации - замены одного аминокислотного остатка, а именно аспарагина в 93-м положении (нумерация по Кабату) исходного антитела 1.103.11 hAb -VH(20975-VL), на остаток серина, в результате чего снижалась вероятность гликозилирования в участке CDR. Хотя 93-й остаток аспарагина расположен в участке CDR3 легкой цепи, согласно компьютерной модели комплекса антиген-антитело, построенной методом молекулярного докинга, этот аминокислотный остаток не имеет прямого контакта ни с каким аминокислотным остатком антигена - человеческого PD-1. Функция связывания с антигеном участка CDR3 легкой цепи выполняется, по-видимому, соседним (91-м) остатком тирозина, который взаимодействует с некоторыми аминокислотными остатками петли FG в молекуле PD-1. Функциональный анализ 1.103.11-v2 hAb с использованием клеток подтвердил, что данная мутация не влияет на связывающую способность (см. результаты экспериментов ниже, а также фиг.15 и 16).

Способность антител 1.103.11-v2 hAb связываться с человеческим PD-1 определяли количественно путем проточной цитометрии (FACS) и ELISA. Фиг. 16 демонстрирует связывание антител 1.103.11-v2 hAbs с клетками CHO, в которых экспрессируется PD-1, в различных буферных растворах; это связывание также проверяли в тех же условиях, в каких выполнялся анализ методом FACS, описанный выше, за исключением того, что антитела разводили либо в буферном растворе, используемом для приготовления фармацевтической композиции, либо в растворе 1xPBS (pH 7,4) и клетки CHO-S, в которых экспрессировался человеческий PD-1, вносили в лунки 96-луночных планшетов с U-образным дном (BD) в концентрации 2×10^5 клеток в 1 мл. Были получены результаты, сравнимые с таковыми для антител 1.103.11 hAb. Формулировка «антитела 1.103.11-v2 hAb в буферном растворе» относится к разведению антител буферным раствором для приготовления фармацевтической композиции, а формулировка «антитела 1.103.11-v2 hAb в PBS» относится к разведению антител раствором 1xPBS (pH 7,4). В обоих указанных растворах антитела связывались с PD-1 на поверхности клеток CHO и не было существенной разницы в аффинности к человеческому PD-1 в указанных двух вариантах условий (в случае 1xPBS EC_{50} составляла около 2,52 нмоль/л, а в случае буферного

раствора для фармацевтической композиции – около 3,12 нмоль/л).

На фиг. 15 представлено связывание антител 1.103.11-v2 hAb с белком PD-1 в различных растворах (по данным ELISA). Эти данные получены по описанному выше протоколу ELISA; продолжительность инкубации с антителами 1.103.11-v2 hAb составляла 2 часа; продолжительность инкубации со вторичными антителами – козьими антителами против Fc человеческого IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (1:5000, Abscam) составляла 1 час. Формулировка «антитела 1.103.11-v2 hAb в буферном растворе» относится к разведению антител буферным раствором для приготовления фармацевтической композиции, а формулировка «антитела 1.103.11-v2 hAb в PBS» относится к разведению антител раствором 1xPBS (pH 7,4). В обоих этих условиях была определена аффинность связывания указанных антител с PD-1.

Клетки CHO, в которых экспрессировался человеческий белок PD-1, инкубировали с различными концентрациями антител против PD-1, после чего добавляли PD-L1, несущий мышинный домен Fc. Определяли связывание человеческого PD-L1 с клетками, в которых экспрессировался PD-1 с помощью козьих антител против мышинового IgG, конъюгированных с FITC, с последующим анализом FACS. Как видно на фиг. 4, антитела против PD-1 блокировали связывание PD-L1 с клетками CHO, трансфицированными PD-1. У антител 1.103.11-v2 hAb также проверяли способность блокировать PD-L1 связывание PD-L1 с клетками CHO, трансфицированными PD-1, и сравнивали полученные результаты с аналогичными данными для антител 1.103.11 hAb.

3.2. Полный кинетический анализ аффинности связывания методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Определяли аффинность и кинетические показатели связывания испытываемых антител с PD-1 методом поверхностного плазмонного резонанса, используя оптический биосенсор ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Протеин А (Sigma) иммобилизовали на сенсорном чипе GLM (Bio-Rad) посредством конъюгации аминов. Очищенные антитела пропускали по поверхности сенсорного чипа, где они связывались с протеином А. Чип поворачивали на 90° и промывали проточным буферным раствором (1xPBS/0,01% Tween20; Bio-Rad) до стабилизации базового уровня. Через проточную ячейку с антителами пропускали проточный буферный раствор и пять концентраций человеческого PD-1 со скоростью 100 мкл/мин; фаза ассоциации длилась 240 с, затем фаза диссоциации – 600 с. После каждого прогона чип регенерировали H₃PO₄ (pH 1,7). Сенсорграммы аппроксимировали к модели Ленгмюра для связывания 1:1. (использовали программное обеспечение ProteOn).

Как видно на фиг. 7, измеренная методом поверхностного плазмонного резонанса аффинность изучаемых антител против PD-1 к рекомбинантному человеческому PD-1

составляла от $3,76E-9$ до $1,76E-10$ моль/л. Аффинность антител 1.103.11-v2 hAb, как ожидалось, сравнима с таковой антител 1.103.11 hAb.

3.3. Ортология (между видами) и гомология (между семействами)

3.3.1. Перекрестная реактивность к PD-1 яванского макака и мышиному PD-1. Перекрестную реактивность антител определяли ELISA. Планшеты (Nunc) покрывали белком PD-1 яванского макака (Sino Biological) и мышиным PD-1 (Sino biological) в концентрации 1 мкг/мл и оставляли на ночь при температуре 4°C. После блокирования и промывки, на планшеты добавляли антитела в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем планшеты промывали и инкубировали с вторичными антителами – козьими антителами против крысиного IgG1, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (Bethyl) и козьими антителами против крысиного IgG2b, конъюгированными с HRP (Bethyl) в течение 45 минут. Промывали и добавляли субстрат - ТМВ; реакцию останавливали добавлением соляной кислоты (2 М). Измеряли поглощение на длине волны 450 нм с помощью микропланшетного ридера (Molecular Device).

Результаты экспериментов по перекрестному связыванию показали, что антитела против PD-1 связываются с белком PD-1 яванского макака, но не связываются с мышиным PD-1 (см. фиг. 6). В таком же эксперименте для антител 1.103.11-v2 hAb получены данные, сравнимые с таковыми, как ожидалось, для антител 1.103.11 hAb.

3.3.2. Перекрестная реактивность к членам семейства PD-1: CD28, CTLA4 и ICOS. Чтобы исследовать перекрестную реактивность полностью человеческих антител к белкам одного семейства, клетки линий, в которых экспрессировались PD-1, CD28, CTLA4 или ICOS окрашивали изучаемыми антителами, с последующей окраской вторичными антителами – конъюгированными с FITC козьими антителами против Fc человеческого IgG. В качестве положительного контроля использовали клетки, в которых экспрессировался PD-1. В качестве отрицательного контроля служили клетки соответствующих исходных линий. Окрашенные клетки анализировали с помощью BD FACSCanto II (Biosciences), и программного обеспечения FlowJo .

На фиг. 5 представлены результаты анализа данных, полученных путем FACS, взаимодействия антител против PD-1 с клетками CHO, трансфицированными PD-1, CD28, и клетками 293F, трансфицированными CTLA4. Видно, что антитела против PD-1 специфично связываются с PD-1, но не с CD28 и CTLA4 из семейства PD-1. В таком же эксперименте для антител 1.103.11-v2 hAb получены данные, сравнимые с таковыми, как ожидалось, для антител 1.103.11 hAb.

3.4. Сортировка эпитопов.

3.4.1 Эпитопы PD-1, с которым связываются антитела против этого белка, анализировали, используя референсные антитела А и В, методом поверхностного плазмонного резонанса, используя ProteOn XPR36 (Bio-Rad) Референсные антитела А и В иммобилизовали по аминокгруппе на сенсорном чипе GLC (Bio-Rad). Раствор человеческого белка PD-1 пропускали по каналам с иммобилизованными антителами, где он захватывался референсными антителами. Затем чип поворачивали на 90° и промывали проточным буферным раствором до стабилизации базового уровня. Отобранные антитела пропускали через сенсорный чип.

3.4.2. Эпитоп PD-1, с которым связываются антитела против этого белка, анализировали, используя референсные антитела А и В, методом FACS. Клетки CHO, в которых экспрессируется и присутствует на клеточной поверхности человеческий PD-1, инкубировали с референсными антителами А и В в концентрации 10 мкг, мл в течение 1 часа. Затем клетки промывали, добавляли к ним антитела против PD-1 по данному изобретению и инкубировали в течение 1 часа. Затем прибавляли вторичные антитела против крысиного IgG, конъюгированные с FITC, и инкубировали в течение 1 часа при температуре 4°C. По истечении этого времени клетки промывали один раз, ресуспендировали в буферном растворе 1XPBS/1%BSA и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра (BD).

Результаты эпитоп-специфичной сортировки методами поверхностного плазмонного резонанса и FACS показали, что эпитоп человеческого белка PD-1, связывающийся с полностью человеческими антителами PD-1 (то есть с антителами 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.139.15 hAb и 1.153.7 hAb) отличается от того, с которым связываются референсные антитела против PD-1 (А и В). В таком же эксперименте для антител 1.103.11-v2 hAb получены данные, сравнимые с таковыми, как ожидалось, для антител 1.103.11 hAb.

3.5. Функциональный клеточный анализ антител против PD-1 *in vitro*.

3.5.1. Влияние антител против человеческого PD-1 на пролиферацию Т-лимфоцитов. Для определения влияния антител против PD-1 на пролиферацию Т-клеток использовали аллогенный иммунный ответ. Осуществляли реакцию смешанной культуры лимфоцитов (MLR), стимулированную первичными дендритными клетками (DC), в 96-луночных планшетах с U-образным дном для культивирования тканей в 200 мкл среды RPMI 1640, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS) и антибиотиков. Дендритные клетки смешивали с суммарными аллогенными CD4⁺Т-лимфоцитами, взятыми в количестве 1X10⁵, в соотношении 1:10 и 1:100 (DC:T). Культивирование проводили в присутствии и в отсутствие нейтрализующих моноклональных антител –

антител против человеческого PD-1 и референсных антител А и В, взятых в концентрации 10 мкг/мл. Образцы инкубировали в течение 5 суток; в последние 16 часов добавляли [³H]тимидин в дозе 1 микрокюри на 1 лунку. Включение [³H]тимидина измеряли с помощью сцинтилляционного счетчика; пролиферацию выражали как среднее по трем лункам включение (число импульсов в минуту) [³H]тимидина. Для одних только дендритных клеток включение составляло обычно менее <1000 импульсов в минуту. Результаты, приведенные в настоящем документе, являются репрезентативными примерами по минимум пяти опытам.

Человеческие дендритные клетки (DC), CD4⁺-, CD8⁺- и суммарные Т-лимфоциты для описанной выше реакции смешанной культуры лимфоцитов получали из PBMC следующим образом. Выделяли из PBMC человеческие моноциты путем отрицательного отбора, используя набор для обогащения человеческих моноцитов Human Monocyte Enrichment Cocktail kit (StemCell Meylan) согласно инструкции производителя. Коротко говоря, проделывали следующее: PBMC выделяли из крови здорового донора в градиенте плотности раствора Ficoll-Raque. После центрифугирования клетки промывали два раза раствором PBS, затем ресуспендировали в концентрации 1X10⁸ клеток/мл в буферном растворе для выделения и инкубировали со смесью антител для обогащения моноцитов при температуре 4°C в течение 30 минут. Клетки промывали и инкубировали с коллоидным раствором магнитных наночастиц при температуре 4°C в течение 30 минут. Немеченые моноциты проходили через колонку сепаратора MACS и их собирали. Чтобы получить незрелые дендритные клетки (iDC), моноциты в концентрации 2X10⁶ клеток/мл культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% FCS и антибиотики, с GM-CSF в количестве 800 Ед/мл (PeproTech, Роки-Хилл, шт. Нью-Джерси, США;) и IL-4 в количестве 500 Ед/мл (PeproTech; 500 U/ml). Через день заменяли половину культуральной среды на среду, содержащую GM-CSF и IL-4. Зрелые дендритные клетки получали путем стимуляции незрелых дендритных клеток липополисахаридом (LPS) в концентрации 1 мкг/мл (026: B6; Sigma-Aldrich, Сент-Луис, шт. Миссури, США) на пятые сутки продолжительностью 24 часа. CD4⁺-, CD8⁺- и суммарные Т-лимфоциты получали путем отрицательного отбора, инкубируя PBMC со смесью для обогащения человеческих CD4⁺-, CD8⁺- и суммарных Т-лимфоцитов и коллоидным раствором магнитных наночастиц согласно инструкциям производителя (Stemsep).

Человеческие (CD4⁺)Т-лимфоциты стимулировали аллогенными дендритными клетками в присутствии или же в отсутствие антител против PD-1 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.139.15 hAb и 1.153.7 hAb. Пролиферацию (CD4⁺)Т-лимфоцитов оценивали по включению [³H]тимидина. На фиг. 10 видно, что антитела 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb,

1.103.11 hAb, 1.139.15 hAb и 1.153.7 hAb усиливали зависимость от концентрации антител пролиферацию Т-лимфоцитов. В таком же эксперименте для антител 1.103.11-v2 hAb получены данные, сравнимые с таковыми, как ожидалось, для антител 1.103.11 hAb.

3.5.2. Влияние антител против человеческого PD-1 на секрецию цитокина IFN γ *in vitro*. Для прямого определения влияния блокирования антителами против человеческого PD-1 образования IFN γ мы провели эксперимент с аллогенным иммунным ответом, используя реакцию смешанной культуры лимфоцитов. Коротко говоря, проделывали следующее: получали человеческие (CD4⁺)Т-лимфоциты путем отрицательного отбора, инкубируя PBMC со смесью для обогащения человеческих (CD4⁺)Т-лимфоцитов согласно инструкциям производителя. Незрелые дендритные клетки получали из моноцитов путем культивирования в присутствии GM-CSF и IL-4 в течение пяти суток, затем стимулировали их дифференцировку, чтобы получить зрелые дендритные клетки, липополисахаридом в концентрации 1 мкг/мл в течение ночи. (CD4⁺)Т-лимфоциты смешивали с незрелыми/зрелыми дендритными клетками в соотношении от 10:1 до 100:1 (Т:DC). Культивировали в присутствии и в отсутствие антител против человеческого PD-1 и референсных антител. Через пять суток собирали супернатант от каждой культуры и определяли содержание цитокина IFN γ . Уровень IFN γ в указанных супернатантах измеряли путем ELISA. Коротко говоря, проделывали следующее: Планшеты MaxiSorp покрывали моноклональными антителами против человеческого гамма-интерферона, разведенными в буферном растворе для покрывания до концентрации 0,75 мкг/мл (то есть разведение 1/1360) в количестве 50 мкл на одну лунку (то есть 3,7 мкл антител и 5 мл буферного раствора на весь 96-луночный планшет) и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C. Блокировали оставшиеся места связывания, добавляя блокирующий буферный раствор в количестве 200 мкл на одну лунку и оставляя планшеты на 2 часа. В качестве стандартных растворов готовили 2-кратные разведения рекомбинантного гамма-интерферона в диапазоне концентраций от 8000 пг/мл до 125 пг/мл в полной среде; кроме того, брали одну только полную среду. Планшеты промывали, добавляли стандартные растворы и испытываемые супернатанты в количестве 100 мкл на одну лунку и инкубировали в течение 2-4 часов. После этого прибавляли биотинилированные моноклональные антитела против гамма-интерферона (1/1333) в блокирующем буферном растворе и затем - пероксидазу хрена с авидином (ExtrAvidin Peroxidase). Для визуализации добавляли субстрат – ТМВ; реакцию останавливали соляной кислотой (2M). Измеряли поглощение на длине волны HCl 450 нм.

Фиг. 9 демонстрирует стимуляцию человеческих (CD4⁺)Т-лимфоцитов аллогенными дендритными клетками в присутствии и в отсутствие антител 1.7.3 hAb,

1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.139.15 hAb и 1.153.7 hAb. Уровень $IFN\gamma$ измеряли путем ELISA. Полученные результаты показывают, что полностью человеческие антитела против PD-1 вызывали усиление образования $IFN\gamma$ зависимым от их дозы образом. В таком же эксперименте для антител 1.103.11-v2 hAb получены данные, сравнимые с таковыми, как ожидалось, для антител 1.103.11 hAb.

3.5.3. Влияние антител против человеческого PD-1 на образование интерлейкина-2 (IL-2) *in vitro*. ($CD4^+$)Т-лимфоциты смешивали с зрелыми/незрелыми дендритными клетками в соотношении от 10:1 до 100:1 (T:DC) Культивировали в присутствии и в отсутствие антител против человеческого PD-1 и референсных антител. Через пять суток собирали супернатант от каждой культуры и определяли содержание цитокина $IFN\gamma$. Уровень интерлейкина-2 в супернатантах измеряли путем ELISA.

Фиг. 8 демонстрирует стимуляцию человеческих ($CD4^+$)Т-лимфоцитов аллогенными дендритными клетками в присутствии и в отсутствие испытываемых или контрольных антител. Уровень интерлейкина-2 измеряли путем ELISA. Полученные результаты показывают, что антитела против PD-1 вызывали усиление образования интерлейкина-2 зависимым от их дозы образом. В таком же эксперименте для антител 1.103.11-v2 hAb получены данные, сравнимые с таковыми, как ожидалось, для антител 1.103.11 hAb.

3.5.4. Влияние антител против человеческого PD-1 на пролиферацию лимфоцитов и образование цитокинов при специфичном иммунном ответе с представлением антигена аутологичными клетками. В этом эксперименте Т-лимфоциты и дендритные клетки были от одного и того же донора. Коротко говоря, проделывали следующее. Получали ($CD4^+$)Т-лимфоциты из РВМС и культивировали их в присутствии пептида pp65 цитомегаловируса (CMV) и низкой дозы IL-2 (20 Ед/мл). Тем временем получали дендритные клетки путем культивирования моноцитов из РВМС того же донора в присутствии (GM-CSF и IL-4. Через пять суток ($CD4^+$)Т-лимфоциты, контактировавшие с пептидом pp65 CMV, культивировали вместе с дендритными клетками, нагруженными пептидом pp65, в присутствии и в отсутствие антител против человеческого PD-1 и референсных антител (в качестве контроля). На пятые сутки из каждой культуры брали 100 мкл супернатанта для измерения содержания цитокинов - $IFN\gamma$ и IL-2. Уровень $IFN\gamma$ и образование IL-2 определяли путем ELISA. Пролиферацию специфичных Т-лимфоцитов в ответ на дендритные клетки, нагруженные пептидом pp65 CMV, определяли по включению [3H]тимидина..

На фиг. 11 показано усиление пролиферации CMV⁺- ($CD4^+$)Т-лимфоцитов, стимулированной аутологичными дендритными клетками, нагруженными пептидом pp65

цитомегаловируса, в результате эффекта антител против PD-1, влияние которых носило зависимый от их концентрации характер. В таком же эксперименте для антител 1.103.11-v2 hAb получены данные, сравнимые с таковыми, как ожидалось, для антител 1.103.11 hAb.

3.5.5. Влияние антител против человеческого PD-1 на супрессивную функцию регуляторных Т-лимфоцитов (T_{reg} s). Субпопуляция Т-клеток, называемых регуляторными Т-лимфоцитами (T_{reg}), играет ключевую роль в модулировании иммунологических реакций и поддержании аутоотолерантности. Регуляторные ($CD4^+CD25^+$)Т-лимфоциты ассоциированы с опухолями: у больных с множественным раком наблюдается увеличенное количество этих клеток и с этим связан плохой прогноз. Чтобы прямо оценить влияние антител против человеческого PD-1 на иммуносупрессию, был проведен эксперимент с T_{reg} . ($CD4^+CD25^+$) и ($CD4^+CD25^-$)Т-лимфоциты выделяли с помощью микрогранул, специфичных против CD25 (Miltenyi Biotec, Оберн, шт. Калифорния, США), путем положительного и отрицательного отбора, соответственно. Вначале выделяли ($CD4^+$)Т-лимфоциты путем отрицательного отбора, инкубируя РВМС со смесью для обогащения человеческих ($CD4^+$)Т-лимфоцитов и используя коллоидный раствор магнитных наночастиц согласно инструкциям производителя (Stemsep). Затем ($CD4^+$)Т-лимфоциты суспендировали в буферном растворе для колонки сепаратора MACS, инкубировали с ($CD25^+$)микрогранулами на льду в течение 30 минут, промывали и загружали в указанную колонку. ($CD4^+CD25^-$)Т-лимфоциты, которые не связывались на колонке, собирали из элюата и промывали перед использованием. После этого извлекали с колонки ($CD4^+CD25^+$)Т-лимфоциты и промывали их перед использованием. T_{reg} культивировали с ($CD4^+CD25^-$)Т-лимфоцитами и дендритными клетками (соотношение регуляторных и эффекторных Т-клеток 1:1) в присутствии антител против человеческого PD-1 в концентрации 10 мкг/мл или в их отсутствие. В качестве отрицательного контроля использовали раствор без антител или изотипический контроль. Через пять суток собирали супернатант от каждой культуры и определяли содержание цитокинов путем ELISA и пролиферацию клеток по включению [3H]тимидина, взятого в концентрации 1 микрокюри на одну лунку при инкубации в течение 18 часов. Включение [3H]тимидина измеряли при помощи сцинтилляционного счетчика. Как видно на фиг. 12, антитела против PD-1 сводили на нет супрессивную функцию T_{reg} и восстанавливали пролиферацию Т-клеток и образование $IFN\gamma$. В таком же эксперименте для антител 1.103.11-v2 hAb получены данные, сравнимые с таковыми, как ожидалось, для антител 1.103.11 hAb.

3.6. Определение ADC) и CDC. Во избежание нежелательной токсичности в

отношении нормальных клеток, несущих PD-1, у отобранных полностью человеческих антител против PD-1 проверяли отсутствие активности, вызывающей ADCC и CDC.

3.6.1. Определение ADCC. Активированные Т-лимфоциты с высоким уровнем экспрессии и наличием на клеточной поверхности белка использовали в качестве клеток-мишеней. Их предварительно инкубировали с различными концентрациями полностью человеческих антител в 96-луночной планшете в течение 30 минут. Затем добавляли активированные IL-2 РВМС (служившие источником НК-клеток, то есть эффекторных клеток) в соотношении 50:1 (эффектор/мишень). Планшеты инкубировали в течение 6 часов при температуре 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. Лизис клеток-мишеней определяли с помощью набора для определения цитотоксичности Cytotoxicity Detection Kit. (Roche). Измеряли оптическую плотность с помощью многофункционального ридера для микропланшетов SpectraMax M5e Plate Reader (Molecular Devices). Полученные результаты показали, что испытанные полностью человеческие антитела против PD-1 не опосредуют ADCC (см. фиг. 13). В таком же эксперименте для антител 1.103.11-v2 hAb получены данные, сравнимые с таковыми, как ожидалось, для антител 1.103.11 hAb.

3.6.2. Определение CDC. В лунках 96-луночного планшета смешивали клетки-мишени (активированные Т-лимфоциты), разбавленный препарат компонентов системы комплемента человека (Quidel; номер по каталогу A112) и полностью человеческие антитела против PD-1 в различных концентрациях. Планшет инкубировали в течение 4 часов при температуре 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. Лизис клеток-мишеней определяли с помощью CellTiter- Glo (Promega; номер по каталогу G7573). В качестве положительного контроля использовали ритуксан (Roche) и клетки В-клеточной лимфомы человека линии Raji (CD2+). Полученные результаты свидетельствуют, что антитела против PD-1 не опосредуют CDC (см. фиг. 14). В таком же эксперименте для антител 1.103.11-v2 hAb получены данные, сравнимые с таковыми, как ожидалось, для антител 1.103.11 hAb.

Пример 4. Картирование эпитопов для полностью человеческих антител.

Для того, чтобы установить разницу в эпитопах для представленного в настоящем документе антитела 1.103.11 hAb и известного антитела против человеческого PD-1, называемого кейтрудой, было проведено аланиновое сканирование человеческого PD-1, и оценен его эффект в отношении связывания с антителами – антителом 1.103.11 hAb, кейтрудой и антителом 11.148.10 (контрольное антитело против человеческого PD-1, которое связывается с эпитопом, не перекрывающимся с эпитопами, с которыми связываются 1.103.11 hAb или кейтруда).

В человеческом белке PD-1 были сделаны мутации, состоявшие в замене остатков аланина на остаток глицина, а всех остальных остатков – на остаток аланина. Для каждого

аминокислотного остатка внеклеточного домена (ECD) человеческого PD-1 были сделаны точечные замены путем двух последовательных этапов полимеразной цепной реакции. На первом этапе в качестве матрицы использовали плазмиду pcDNA3.3-hPD-1_ECD.His, кодирующую внеклеточный домен человеческого PD-1 и C-концевую гистидиновую метку, и набор мутагенных праймеров; при этом использовали набор для сайт-направленного мутагенеза QuikChange lightning multi-site-directed mutagenesis kit (Agilent technologies, Пало-Альто, шт. Калифорния, США). Для расщепления исходной матрицы после реакции синтеза мутантной цепи ДНК использовали эндонуклеазу Dpn I. На втором этапе амплифицировали экспрессионную кассету – линейную ДНК, включающую промотор цитомегаловируса, нуклеотидную последовательность, кодирующую внеклеточный домен PD-1, гистидиновую метку и сигнал полиаденилирования тимидинкиназы вируса герпеса, и обеспечивали ее временную экспрессию в клетках HEK293F (Life Technologies, Гейтерсберг, шт Мэриленд, США).

Лунки планшетов для анализа связывания методом иммуноферментного анализа (ELISA) покрывали моноклональными антителами 1.103.11 hAb, кейтрудой и антителами 11.148.10 hAb. После взаимодействия с супернатантами, содержащими мутантный PD-1, добавляли в качестве детекционных антител антитела против гистидиновой метки, конъюгированные с пероксидазой хрена (Rockland; номер по каталогу 200-303-382). Измеренные значения поглощения нормализовали по среднему для контрольных мутантных белков. После введения дополнительной границы отличия отрицательных результатов от положительных для кратности изменения связывания ($<0,55$), окончательно идентифицировали аминокислотные остатки эпитопа.

Тридцать мутантных вариантов человеческого PD-1 с точечными аминокислотными заменами, наиболее существенно снижавшими связывание с антителами, представлены в таблице 2. Проверка положений этих аминокислотных остатков по кристаллической структуре человеческого PD-1 (код в банке данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот (PDB) 3RRQ и 4ZQK) показала, что некоторые аминокислотные остатки (например, Val144, Leu142, Val110, Met108, Cys123 и др..) располагаются в глубине белковой глобулы, и маловероятно, что они контактируют с какими-либо антителами. Наблюдаемое снижение связывания, скорее всего, обусловлено нестабильностью или даже разрушением структуры человеческого белка PD-1 после аланиновых замен. Чтобы избежать неправильной интерпретации данных как указывающих на «горячие точки» эпитопа, мы воспользовались контрольным антителом 11.148.10 hAb, которое связывается совершенно с другим участком антигенного белка, но должно давать реакцию на разрушение структуры белка PD-1, если таковое имеет место.

Мутантные варианты, с которыми изменялось связывание обоих антител расценивались как «фальшивые горячие точки» и исключались из рассмотрения. После введения дополнительной границы отличия отрицательных результатов от положительных для кратности изменения связывания ($<0,55$), окончательно идентифицировали аминокислотные остатки эпитопа, что представлено в таблице 3. Эти аминокислотные остатки занимают 9 положений в антителе

1.103.11 hAb, 5 положений в кейтруде и 10 - в контрольном антителе 11.148.10 hAb.

Таблица 2. Влияние точечных мутаций в PD-1 на связывание с антителами

PD-1 № аминокислотного остатка			PD-1 № аминокислотного остатка			PD-1 № аминокислотного остатка		
1.103.11 hAb			Кейтруда			11.14810 hAb		
Кратность изменения [*]		SD	Кратность изменения [*]		SD	Кратность изменения [*]		SD
V 144	0,22	0,00	P 89	0,18	0,02	V 144	0,03	0,01
A 129	0,22	0,00	D 85	0,38	0,01	F 56	0,06	0,02
D 85	0,24	0,01	V 144	0,40	0,01	L 142	0,09	0,00
P 83	0,30	0,01	R 94	0,46	0,04	D 48	0,21	0,01
L 128	0,32	0,01	F 106	0,47	0,05	R 143	0,26	0,01
V 64	0,32	0,01	K 78	0,48	0,00	C 123	0,27	0,01
Q 133	0,37	0,03	P 83	0,50	0,01	F 106	0,29	0,04
P 130	0,41	0,00	D 92	0,50	0,02	V 44	0,34	0,01
F 106	0,41	0,02	P 39	0,54	0,00	L 41	0,35	0,00
K 131	0,43	0,01	A 81	0,57	0,01	A 50	0,35	0,02
L 142	0,44	0,00	C 123	0,57	0,01	F 95	0,37	0,01
C 123	0,46	0,00	N 66	0,57	0,03	V 43	0,37	0,01
A 132	0,53	0,01	L 142	0,59	0,01	V 110	0,41	0,01
P 39	0,55	0,02	F 82	0,61	0,03	M 108	0,43	0,11
M 108	0,56	0,00	F 95	0,61	0,04	R 94	0,46	0,12
F 52	0,59	0,00	F 52	0,63	0,01	C 93	0,48	0,03
K 135	0,62	0,01	M 108	0,64	0,06	R 86	0,49	0,01
S 137	0,62	0,01	L 128	0,68	0,01	D 117	0,49	0,12
F 95	0,63	0,02	I 126	0,72	0,01	A 113	0,51	0,01
I 126	0,64	0,01	A 113	0,72	0,01	T 45	0,51	0,03
F 82	0,65	0,01	V 110	0,73	0,04	L 42	0,53	0,01
I 134	0,69	0,01	G 47	0,73	0,01	A 40	0,54	0,00
R 94	0,70	0,01	D 117	0,73	0,07	P 39	0,55	0,00
A 50	0,73	0,01	N 49	0,73	0,00	G 90	0,56	0,08
D 117	0,73	0,01	S 87	0,74	0,06	N 49	0,58	0,01
A 113	0,73	0,02	L 42	0,76	0,01	S 137	0,58	0,02
N 49	0,73	0,01	N 102	0,76	0,01	Y 68	0,58	0,03
L 65	0,75	0,01	W 67	0,81	0,01	W 67	0,60	0,03
W 67	0,76	0,01	P 101	0,81	0,04	F 52	0,60	0,05
G 47	0,77	0,00	A 80	0,82	0,01	R 69	0,61	0,05

Жирным шрифтом выделены аминокислотные остатки, перекрывающиеся с таковыми контрольного антитела 11.148.10 hAb для поддержания структуры, которые были исключены из рассмотрения как «горячие точки»

^a Кратность изменения относительно связывания при нескольких «молчащих» аланиновых заменах

SD – стандартное отклонение

Таблица 3. Идентификация потенциальных эпитопов

PD-1 с 1.103.11 hAb	Где расположен аминокислот- ный остаток	PD-1 с кейтрудой	Где расположен аминокислот- ный остаток	PD-1 с 1.148.10 hAb	Где расположен аминокислот- ный остаток
V 64	C	K 78	C'	L 41	A'
P 83	C'	P 83	C'	V 43	A'
D 85	C''	D 85	C''	V 44	A'
L 128	FG	P 89	C''	T 45	A'
A 129	FG	D 92	C''D	D 48	A'B
P 130	FG			A 50	B
K 131	G			F 56	B
A 132	G			R 86	C''
Q 133	G			C 93	C''D
				R 143	G

Порог кратности изменения

<0,55

* C, C', C'', F, G, A' представляют пептидные цепочки в кристаллической структуре человеческого белка PD-1 (см. фиг. 17). Цепочка C'', наблюдаемая в мышинном PD-1 отсутствует в структуре человеческого PD-1. Вместо этого β-слоя в человеческом PD-1 имеется петля без особой структуры. Для обозначения этого участка мы все же используем обозначение C'' - просто, чтобы было легче сравнивать с мышинным белком PD-1.

При сравнении аминокислотных остатков, взаимодействующих с эпитопом, в антителах 1.103.11 hAb и кэйтруда (таблица 3) обнаруживаются только два перекрывающихся «горячих» аминокислотных остатка. Остальные аминокислотные остатки довольно разнообразны – это, вероятно, указывает на то, что в данных двух антитела механизмы приспособления к связыванию с человеческим PD-1 и блокированию его лиганда (hPD-L1) весьма различны. По данным, приведенным в таблице 3, нелегко предположить, каковы эти механизмы. Для большей наглядности и сравнения все данные таблицы 3, а также участок связывания лиганда (hPD-L1) соотнесли с кристаллической структурой человеческого белка PD-1 (см. фиг. 17).

Как видно на фиг. 17, «горячие» аминокислотные остатки, ответственные за связывания с hPD-L1, группируются в середине цепей C, F и G (фиг. 17A). Антитела 1.103.11 hAb и кэйтруда, которые оба обладают функцией связывания человеческого PD-1 и блокирования его лиганда (hPD-L1) явно взаимодействуют с разными эпитопами (фиг.

17В для 1.103.11 hAb и 17С для кейтруды). В формировании эпитопа для кейтруды участвуют в основном аминокислотные остатки петли С'D (соответствует цепи С'' в мышине PD-1), которая совершенно не пересекается с участком связывания PD-L1. Из этого следует, что в кейтруде функция блокирования связывания человеческого PD-1 с его лигандом (PD-L1) определяется более стерическим несоответствием, обусловленным размерами молекулы антитела. Напротив, эпитоп для нашего основного антитела 1.103.11 hAb образован «горячими» аминокислотными остатками, расположенными в разных местах, и этот эпитоп непосредственно перекрывается с участком связывания PD-L1 (фиг. 17А, 17В). Данное антитело (1.103.11 hAb) блокирует связывание человеческого PD-1 с его лигандом (PD-L1), выигрывая в конкуренции за взаимодействие с участком связывания, общим для него и для hPD-L1. Таким образом, можно ожидать, что антитело 1.103.11 hAb более функционально для дальнейших разработок.

Однако антитело 11.148.10 hAb, связывается с белком PD-1 в совершенно другом месте (см. фиг. 17D) нежели два функциональных антитела, которые зарекомендовали себя хорошим контролем для отслеживания функции hPD-1 при осуществлении аланиновых замен.

Хотя в настоящем документе данное изобретение конкретно продемонстрировано и описано на примере определенных воплощений (некоторые из них являются предпочтительными), следует учесть, что специалисты в данной области техники могут различным образом изменять их по форме и в деталях, не отклоняясь от принципов и объема данного изобретения, как оно представлено в настоящем документе.

SEQUENCE LISTING

<110> WuXi Biologics (Shanghai) Co. Ltd.
Open Monoclonal Technology, Inc

<120> NOVEL ANTI-PD-1 ANTIBODIES

<130> 053674-8008WO02

<160> 68

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Thr Thr Tyr Tyr Trp Val
1 5

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

agtactactt actactgggt c

21

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 4

<211> 48

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

agtatctctt atagtgaggaa cacctactac aatccgtccc tcaagagt

48

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

His Leu Gly Tyr Asn Gly Arg Tyr Leu Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 6
<211> 39
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
catctagggt ataatgggag gtacctcccc tttgactac

39

<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 8
<211> 42
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
actggaacca gcagtgacgt tggtttttat aactatgtct cc

42

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Asp Val Thr Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
gatgtcacta atcggcctc a

21

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Ser Ser Tyr Thr Ser Ile Ser Thr Trp Val
1 5 10

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
agctcatata caagcatcag cacttgggtg 30

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Ser Ser Thr Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14
agtagtactt actactgggg c 21

<210> 15
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15
Ser Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 16
<211> 48
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 16
agtatctctt atagtgggag cacctactac aatccgtccc tcaagagt 48

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 18
gatgtcagta atcggccctc a 21

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Ser Ser Tyr Thr Asn Ile Ser Thr Trp Val
1 5 10

<210> 20
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 20

agctcatata caaacatcag cacttgggtg

30

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Ser Thr Thr Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 22

agtactactt actactgggg c

21

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Ser Ile Ser Tyr Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 24
<211> 48
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 24

agtatctctt atagtgggac cacctactac aaccctgcc tcaagagt

48

<210> 25
<211> 13
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

His Leu Gly Tyr Asn Ser Asn Trp Tyr Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 26

<211> 39

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

catctcgggt ataacagcaa ctggtaccct tttgactac

39

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Arg Val Ser
1 5 10

<210> 28

<211> 42

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

actggaacca gcagtgacgt tggtagttat aaccgtgtct cc

42

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

gaggtcagta atcggcctc a

21

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Trp Val
1 5 10

<210> 32
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 32
agctcatata caagcagcag cacttgggtg 30

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Ser His Ala Met Ser
1 5

<210> 34
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 34
agccatgcca tgagc 15

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

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

Gly

<210> 36
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 36
actattactg gtggtggtgg tagcatatac tacgcagact ccgtgaaggg c 51

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Asn Arg Ala Gly Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 38
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 38
aacgcgctg gggaggggta ctttgactac 30

<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Gly Gly Asp Asn Ile Gly Asn Lys Asp Val His
1 5 10

<210> 40
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 40
gggggagaca acattggaaa taaagatgtg cac 33

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Arg Asp Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 42
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 42
agggatagca accggcctc t 21

<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Gln Val Trp Asp Ser Ile Trp Val
1 5

<210> 44
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 44
caggtgtggg acagcatttg ggtg

24

<210> 45
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Ser Thr
20 25 30

Thr Tyr Tyr Trp Val Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn His Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Ala Ala Thr Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg His Leu Gly Tyr Asn Gly Arg Tyr Leu Pro Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 46
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgaccctc 60
acctgcactg tctctggtga ctccatcagc agtactactt actactgggt ctggatccgc 120
cagccccag ggaagggact ggagtggatt gggagtatct cttatagtgg gaacacctac 180
tacaatccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatccgtag acacgtcaa gaaccacttc 240
tcctgaagc tgagttctgt ggccgccaca gacacggctc tatattactg tgcgagacat 300

ctagggtata atgggaggta cctccccttt gactactggg gccagggaac cctgggtcacc 360
gtctctctcc 369

<210> 47
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ile
85 90 95

Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 48
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 48

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggt ttttataact atgtctcctg gtaccaacag 120
caccaggca aagccccga actcatgatt tatgatgtca ctaatcggcc ctcaggggtt 180
tctgatcgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgacat ctctgggctc 240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcatcag cacttgggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 49
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Thr Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Asp Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg His Leu Gly Tyr Asn Gly Arg Tyr Leu Pro Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 50

<211> 369

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 50

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtactt actactgggg ctggatccgc 120

cagccccag ggaagggact ggagtggatt gggagtatct cttatagtgg gagcacctac 180

tacaatccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatccgtag acacgtccaa gaaccagttc 240

tcctgaagc tgagctctgt gaccgacgca gacacggctg tgtattactg tgcgagacat 300

ctaggtata atgggaggtta cctccccttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360

gtctcctcc 369

<210> 51

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Glu Val
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ile
85 90 95

Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 52
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 52
cagtctgccc tgactcagcc tgccctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
tcttgactctg gaaccagcag tgacgttggt ttttataact atgtctcctg gtaccaacag 120
caccaggca aagccccga agtcatgatt tatgatgtca gtaatcggcc ctcagggggt 180
tctgatcgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgactat ctctgggctc 240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcatcag cacttgggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gactgtccta 330

<210> 53
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Ala Asp Ser Ile Ser Ser Thr
20 25 30

Thr Tyr Tyr Trp Val Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Val Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Ala Ala Thr Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg His Leu Gly Tyr Asn Gly Arg Tyr Leu Pro Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 54
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 54
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgaccctc 60
acctgcactg tctctgctga ctccatcagc agtactactt actactgggt ctggatccgc 120
cagccccag ggaagggact ggagtggatt gggagtatct cttatagtgg gagcacctac 180
tacaatccgt ccctcaagag tcgagtcacc gtatccgtag acacgtccaa gaaccagttc 240
tcctgaagc tgaactctgt ggccgccaca gacacggctc tatattactg tgcgagacat 300
ctaggtata atgggaggta cctccccttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360
gtctcctcc 369

<210> 55
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Asn Ile
85 90 95

Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 56
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 56
cagtctgcc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
tctgcaactg gaaccagcag tgacgttggt tttataact atgtctcctg gtaccaacag 120
caccaggca aagccccga actcatgatt tatgatgtca gtaatcggcc ctcaggggtt 180
tctgatcgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgacat ctctgggctc 240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caaacatcag cacttgggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 57
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Thr
20 25 30

Thr Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Ser Tyr Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Pro Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Ile
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ser Leu Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg His Leu Gly Tyr Asn Ser Asn Trp Tyr Pro Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 58
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 58
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cctcggagac cctgtccctc 60
acctgactg tctctggtgg ctccatcagc agtactactt actactgggg ctggatccgc 120
cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagtatct cttatagtgg gaccacctac 180
tacaaccgt ccctcaagag tcgagtcacc atccccgtag acacgtccaa gaaccagatc 240
tcctgaaac tgagctctgt gaccgccgca gacacgtctt tgtattattg tgcgagacat 300
ctcgggtata acagcaactg gtaccctttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360
gtctcctca 369

<210> 59
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

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

<210> 60
<211> 330

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 60
cagtcggccc tgactcagcc tccctccgtg tccgggtctc ctggacagtc agtcaccatc 60
tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggt agttataacc gtgtctcctg gtaccagcag 120
ccccaggca cagccccga agtcattatt tatgagggtca gtaatcggcc ctcaggggctc 180
cctgatcgct tctctgggct caagtctggc aacacggcct cctgacat ctctgggctc 240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcagcag cacttggggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 61
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61
Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser His
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu 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 Lys Asn Arg Ala Gly Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 62
<211> 357
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 62
gagggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggctc cctgagactg 60

tcctgcgag cctctggatt cacctttagc agccatgcca tgagctgggt cgcagggt 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcaact attactggtg gtggtggtag catatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attattgtgc gaaaaaccgc 300
gctggggagg gttactttga ctactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 63
<211> 105
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Leu Ser Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Asn Lys Asp Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Arg Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Gly Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ile Trp Val Phe
85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 64
<211> 315
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 64

tcctatgagc tgactcagcc actctcagtg tcagtggccc tgggacagac ggccaggatt 60
acctgtgggg gagacaacat tggaaataaa gatgtgcact ggtaccagca gaagccaggc 120
caggcccctg tgctggtcat ctatagggat agcaaccggc cctctgggat ccctgagggg 180
ttctctggct ccaactcggg gaacacggcc accctgacca tcagcagagc ccaagccggg 240
gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg gacagcattt ggggtgttcgg cggagggacc 300
aagctgaccg tccta 315

<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthesis

<400> 65

Ser Ser Tyr Thr Ser Ile Ser Thr Trp Val
1 5 10

<210> 66
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthesis

<400> 66
agctcatata caagcatcag cacttgggtg

30

<210> 67
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthesis

<400> 67

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ile
85 90 95

Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 68
<211> 330
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthesis

<400> 68
cagtctgcc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
tcttgactg gaaccagcag tgacgttggt ttttataact atgtctcctg gtaccaacag 120
caccaggca aagccccga actcatgatt tatgatgtca gtaatcggcc ctcaggggtt 180
tctgatcgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgacat ctctgggctc 240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcatcag cacttgggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Изолированное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые содержат аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи, выбираемые из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 13, 15, 21, 23, 25, 33, 35 и 37.

2. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по пункту 1, которые содержат последовательности CDR легкой цепи, выбираемые из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 9, 11, 17, 19, 27, 29, 31, 39, 41, 43 и 65.

3. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, выбираемую из группы, состоящей из:

- вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 3 и/или 5;

- вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, 15 и/или 5;

- вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 15 и/или 5;

- вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, 23 и/или 25; и

- вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, 35 и/или 37.

4. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, содержащие вариабельную область легкой цепи, выбираемую из группы, состоящей из:

- вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 9 и/или 11;

- вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 17 и/или 11;

- вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 17 и/или 19;

- вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, 29 и/или 31;

- вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, 41 и/или 43; и

- вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 17 и/или 65.

5. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, содержащие:

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, 3 и/или 5, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, 9 и/или 11;

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 13, 15 и/или 5, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, 17 и/или 11;

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, 15 и/или 5, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, 17 и/или 19;

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 21, 23 и/или 25, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 27, 29 и/или 31;

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 33, 35 и/или 37, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39, 41 и/или 43, или

- переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 15 и/или 5, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 17 и/или 65.

6. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, содержащие переменную область тяжелой цепи, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, 49, 53, 57 и 61.

7. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, содержащие переменную область легкой цепи, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 47, 51, 55, 59, 63 и 67.

8. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, содержащие:

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 45, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 47;

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 49, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 51;

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 53, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 55;

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 57, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 59;

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 61, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 63; или

- переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 53, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 67.

9. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, способные специфично связываться с человеческим PD-1 при значении K_d не более 10^{-8} М по данным, полученным методом поверхностного плазмонного резонанса.

10. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, связывающиеся с обезьяньим PD-1 с EC_{50} не более 100 нМ, или не более 10 нМ, и/или не связывающиеся с мышинным PD-1.

11. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, способные подавлять связывание человеческого или обезьяньего PD-1 с его лигандом с IC_{50} не более 100 нМ.

12. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, в основном не связывающиеся с CD28 или CTLA4.

13. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, не опосредующие ADCC или CDC, или и ни то ни другое.

14. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, являющееся полностью человеческим моноклональным антителом.

15. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по пункту 14, причем такое полностью человеческое моноклональное антитело продуцируется трансгенными крысами.

16. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, конкурирующие за один и тот же эпитоп с антителом или его антиген-связывающим фрагментом, по любому из предыдущих пунктов.

17. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, способные блокировать связывание человеческого PD-1 с его лигандом и тем самым обеспечивающие по меньшей мере одну из следующих активностей:

- индукция образования IL-2 в $(CD4^+)$ Т-лимфоцитах;
 - индукция образования $IFN\gamma$ в $(CD4^+)$ Т-лимфоцитах;
 - индукция пролиферации $(CD4^+)$ Т-лимфоцитов; и
- d) нивелирование супрессивной функции Treg.

18. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, являющиеся камелизированными однодоменными антителами, диателами, scFv, димерами scFv, BsF, dsFv, $(dsFv)_2$, dsFv-dsFv', фрагментами Fv, Fab, Fab' и F(ab')₂, ds диателами, нанотелами, доменными антителами или бивалентными доменными антителами.

19. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, содержащие также константную область иммуноглобулина.

20. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, содержащие также конъюгат.

21. Изолированный полинуклеотид, кодирующий антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по пунктам 1-19.

22. Вектор, содержащий изолированный полинуклеотид по пункту 21.

23. Клетка-хозяин, содержащая вектор по пункту 22.

24. Способ экспрессирования антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пунктов 1-19, включающий культивирование клеток-хозяев по пункту 23 в условиях, в которых экспрессируется полинуклеотид по пункту 21.

25. Набор, содержащий антитело или антиген-связывающий фрагмент по любому из пунктов 1-20.

26. Способ лечения индивида от состояния, ассоциированного с PD-1, который включает введение этому индивиду терапевтически эффективного количества антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пунктов 1-20.

27. Способ по пункту 26, когда установлено, что у данного индивида имеется расстройство или состояние, при котором, вероятно, эффективны антагонисты PD-1.

28. Способ по пункту 27, когда установлено, что в биологическом образце, взятом у данного индивида, присутствует PD-L1 или его уровень повышен.

29. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из пунктов 1-20 и один или более фармацевтически приемлемых носителей.

30. Способ лечения состояния у индивида, при котором должно помогать усиление иммунного ответа и который включает введение данному индивиду терапевтически эффективного количества антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пунктов 1-20.

31. Способ по пункту 30, когда у данного индивида усилена экспрессия PD-L1.

32. Применение антитела или его антиген-связывающего фрагмента, по любому из пунктов 1-20 при изготовлении лекарственного средства для лечения состояния, при котором должно помогать усиление иммунного ответа.

33. Применение по пункту 32, когда подлежащее лечению состояние является раком или хронической вирусной инфекцией.

34. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по пункту 16, эпитоп для которых содержит по меньшей мере один из следующих аминокислотных остатков PD-1: V64, P83, D85, L128, A129, P130, K131, A132 и Q133.