



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.07

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(21) Номер заявки
201991214

(22) Дата подачи заявки
2017.11.17

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-1 И ИХ КОМПОЗИЦИИ

(31) 62424163

(32) 2016.11.18

(33) US

(43) 2019.10.31

(86) PCT/EP2017/079615

(87) WO 2018/091661 2018.05.24

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СИМФОГЕН А/С (DK)

(72) Изобретатель:
**Лангто Йохан (SE), Букен Томас,
Кофод Клаус, Геттинг Торбен, Бхатиа
Викрам Келлер, Гад Моника, Галлер
Гюнтер Роланд, Фрелих Камилла
(DK)**

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

(56) JU YEON LEE ET AL.: "Structural basis of checkpoint blockade by monoclonal antibodies in cancer immunotherapy", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 7, 31 October 2016 (2016-10-31), p. 13354, XP055438772, DOI: 10.1038/ncomms13354, the whole document

CRAIG FERNWICK: "Identification of novel antagonistic anti-PD-1 antibodies that are non-blocking of the PD-1/PD-L1 interaction: Journal of Clinical Oncology: vol 34, № 15_suppl", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 34, № 15, 1 May 2016 (2016-05-01), p. 3072, XP055438777, DOI: 10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.3072, the whole document

WO-A1-2006121168

WO-A1-2016092419

WO-A2-2016014688

WO-A1-2015112800

WO-A1-2015035606

WO-A1-2008156712

SCAPIN GIOVANNA ET AL.: "Structure of full-length human anti-PD1 therapeutic IgG4 antibody pembrolizumab", NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, US, vol. 22, № 12, 1 December 2015 (2015-12-01), p. 953-958, XP002766296, ISSN: 1545-9985, the whole document

WO-A1-2015112900

Anonymous: "Naturally optimized human antibodies", 12 March 2016 (2016-03-12), XP055439016, retrieved from the Internet: URL: <http://content.stockpr.com/omniab/db/252/746/file/OmniAb.pdf> [retrieved on 2018-01-09], the whole document

(57) Изобретение относится к антителам против PD-1 и их применению в способе усиления иммунитета у пациента и способе лечения злокачественной опухоли у пациента. Кроме того, заявлена фармацевтическая композиция, содержащая эти антитела, выделанная молекула, их кодирующая, вектор экспрессии, клетка-хозяин и биспецифическое антитело.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной патентной заявки США № 62/424163, поданной 18 ноября 2016 г., полное содержание которой приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

Список последовательностей

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который принят электронно в формате ASCII и полное содержание которого, таким образом, приведено в качестве ссылки. Электронная копия списка последовательностей, созданная 13 ноября 2017 г., названа 022675_WO056_SL.txt и имеет размер 99158 байт.

Уровень техники для изобретения

PD-1, также известный как белок 1 программируемой гибели клеток и CD279, представляет собой рецептор клеточной поверхности из 268 аминокислот, который принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов. PD-1 является членом семейства Т-клеточных регуляторов CD28 и экспрессируется на Т-клетках, В-клетках и макрофагах. Он связывает лиганды PD-L1 (также известный как гомолог B7) и PD-L2 (также известный как B7-DC).

PD-1 представляет собой мембранный белок типа I, структура которого включает внеклеточный домен IgV, трансмембранную область и внутриклеточный хвост, содержащий два участка фосфорилирования. Известный как белок иммунной контрольной точки, PD-1 функционирует как индуцируемый иммуномодулирующий рецептор, играющий роль, например, в отрицательной регуляции Т-клеточных ответов на стимуляцию антигеном.

PD-L1 является преобладающим лигандом для PD-1. Связывание PD-L1 с PD-1 ингибирует Т-клеточную активность, уменьшая продукцию цитокинов и супрессируя пролиферацию Т-клеток. Клетки злокачественных опухолей, экспрессирующие PD-L1, являются способными использовать этот механизм для инактивации противоопухолевой активности Т-клеток посредством связывания PD-L1 с рецептором PD-1.

Принимая во внимание его свойства регуляции иммунного ответа, PD-1 исследовали в качестве потенциальной мишени для иммунотерапии, включая лечение злокачественных опухолей и аутоиммунных заболеваний. Два антитела против PD-1, пембролизумаб и ниволумаб, одобрены в Соединенных Штатах и Европе для лечения определенных злокачественных опухолей.

Принимая во внимание критическую роль PD-1 в качестве иммуномодулятора, существует необходимость в новых и улучшенных иммунотерапевтических средствах, нацеленных на рецептор PD-1, для лечения злокачественных опухолей и определенных нарушений иммунной системы.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к новым рекомбинантным антителам, нацеленным на PD-1, так же как к фармацевтическим композициям, содержащим одно или несколько из этих антител, и к применению антител и фармацевтических композиций для усиления иммунитета у пациента, и для лечения злокачественных опухолей, происходящих из таких тканей, как кожа, легкие, кишечник, ободочная кишка, яичник, головной мозг, предстательная железа, почка, мягкие ткани, гематопозитическая система, голова и шея, печень, мочевого пузыря, молочная железа, желудок, матка и поджелудочная железа. По сравнению с доступными в настоящее время способами лечения таких злокачественных опухолей, включая способы лечения антителами, предусматривают, что антитела по изобретению могут обеспечивать превосходный клинический ответ либо отдельно, либо в комбинации с другим противораковым лекарственным средством, таким как антитело, нацеленное против другого белка иммунной контрольной точки.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу против PD-1 или его антигенсвязывающей части, где антитело конкурирует за связывание с PD-1 человека с любым из антител или связывает такой же эпитоп PD-1 человека, как любое из антител 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 и 18483.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 конкурирует за связывание с PD-1 человека с антителом, CDR1-3 тяжелой цепи (H) и CDR1-3 легкой цепи (L) которого являются такими же как или происходящими из H-CDR1-3 и L-CDR1-3 антитела 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 или 18483.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 связывает тот же самый эпитоп PD-1 человека, что и антитело, CDR1-3 тяжелой цепи (H) и CDR1-3 легкой цепи (L) которого являются такими же как или происходящими из H-CDR1-3 и L-CDR1-3 антитела 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 или 18483.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 содержит H-CDR1-3, содержащие аминокислотные последовательности H-CDR1-3, соответственно, антитела 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 или 18483.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 имеет переменный домен (VH) тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентичный по аминокислотной последовательности домену VH антитела 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 или 18483.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 имеет VH, содержащий аминокислотную последовательность VH антитела 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 или 18483.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 имеет тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность VH антитела 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 или 18483 и аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 26.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 содержит L-CDR1-3, содержащие аминокислотные последовательности L-CDR1-3, соответственно, антитела 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 или 18483.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 имеет переменный домен легкой цепи (VL), по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентичный по аминокислотной последовательности домену VL антитела 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 или 18483.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 имеет VL, содержащий аминокислотную последовательность VL антитела 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 или 18483.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 имеет легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность VL антитела 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 или 18483 и аминокислотную последовательность константной области легкой цепи из SEQ ID NO: 28.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 содержит аминокислотные последовательности H-CDR3 и L-CDR3 антитела 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 или 18483.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 содержит аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 антитела 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 или 18483.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 имеет VH и VL, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентичные по аминокислотной последовательности VH и VL, соответственно, антитела 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 или 18483.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 имеет VH и VL, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей VH и VL, соответственно, антитела 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 или 18483.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 имеет HC и LC, содержащие или состоящие из аминокислотных последовательностей HC и LC, соответственно, антитела 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 или 18483.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 имеет (1) HC, содержащую аминокислотную последовательность VH антитела, выбранного из группы, состоящей из антитела 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 и 18483, и аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 26; и (2) LC, содержащую аминокислотную последовательность VL этого выбранного антитела и аминокислотную последовательность константной области легкой цепи из SEQ ID NO: 28.

В конкретных вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть по изобретению имеет по меньшей мере одно из следующих свойств:

- связывается с PD-1 яванского макака с K_D , например, 4×10^{-8} М или менее;
- связывается с PD-1 мыши с K_D , например, 2×10^{-8} М или менее;
- связывается с PD-1 человека с K_D 3×10^{-9} М или менее;
- ингибирует взаимодействие PD-1 с PD-L1 в концентрации 10 мкг/мл;
- стимулирует продукцию IL-2 в анализе цельной крови с SEB; и
- стимулирует продукцию IFN- γ в анализе односторонней реакции смешанной культуры лимфоцитов.

Примеры такого антитела включают без ограничения антитела 18040, 18049, 18098, 18113, 18247, 18250, 18325, 18366, 18413 и 18483 (имеющие свойства а) и с)-f)) и антитела 18201 и 18400 (имеющие свойства а)-f)). В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть по изобретению имеет все из указанных свойств.

В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть по изобретению конкурирует за связывание с PD-1 человека с антителом 18366, 18250, 18040, 18247, 18113 и/или 18483. В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть по изобретению конкурирует за связывание с PD-1 человека с антителом 12760 и/или 13112.

В конкретных вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть по

изобретению не конкурирует за связывание с PD-1 с пембролизумабом или ниволумабом. В конкретных вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть по изобретению не связывается с тем же эпитопом, что и пембролизумаб или ниволумаб.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим по меньшей мере одно антитело против PD-1 или его антигенсвязывающую часть, как описано в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый наполнитель необязательно с дополнительным лекарственным средством, таким как противораковое терапевтическое антитело.

Кроме того, настоящее изобретение относится к выделенным молекулам нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или обе, из антитела против PD-1, как описано в настоящем описании.

Настоящее изобретение также относится к векторам, содержащим такую выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, где указанный вектор может дополнительно содержать последовательность для контроля экспрессии.

Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или обе, из антитела против PD-1, как описано в настоящем описании.

Настоящее изобретение также относится к способу получения антитела или его антигенсвязывающей части, как описано в настоящем описании, включающему получение клетки-хозяина, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, и нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, из антитела против PD-1 как описано в настоящем описании, культивирование указанной клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии антитела или части, и выделение полученных антитела или части.

Настоящее изобретение также относится к мультиспецифической (например, биспецифической) связывающей молекуле, имеющей специфичность связывания антитела против PD-1 описанный в настоящем описании и специфичность связывания другого, отличного антитела, такого как другое антитело против PD-1 (например, как описано в настоящем описании) или антитело, нацеленное на отличный белок, такой как другой белок иммунной контрольной точки, антиген злокачественной опухоли злокачественной опухоли, или другая молекула поверхности клетки, активность которой опосредует состояние заболевания, такого как злокачественная опухоль. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула содержит антигенсвязывающие части (например, шесть CDR) из антитела против PD-1 и другого антитела.

Настоящее изобретение также относится к способу усиления иммунитета у пациента (например, пациента-человека), включающему введение указанному пациенту антитела против PD-1 или его антигенсвязывающей части, фармацевтической композиции, или биспецифической связывающей молекулы, как описано в настоящем описании.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли у пациента (например, пациента-человека), включающему введение указанному пациенту антитела против PD-1 или его антигенсвязывающей части, фармацевтической композиции, или биспецифической связывающей молекулы, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль происходит из ткани, выбранной из кожи, легкого, кишечника, ободочной кишки, яичника, головного мозга, предстательной железы, почки, мягких тканей, гематопоетической системы, головы и шеи, печени, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, матки и поджелудочной железы. Злокачественная опухоль может представлять собой, например, находящуюся на поздних стадиях или метастазирующую меланому, мелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак желудка, почечноклеточный рак, печеночноклеточную карциному, колоректальный рак или лимфому Ходжкина.

Любой из вышеописанных способов может дополнительно включать введение, например, химиотерапевтического средства, антинеопластического средства, антиангиогенного средства, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора пути PD-1 или радиотерапии.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению композиции антител, содержащей антитело против PD-1 или антигенсвязывающую часть, как описано в настоящем описании, для изготовления лекарственного средства для лечения злокачественной опухоли у пациента и/или усиления иммунитета у пациента.

Кроме того, настоящее изобретение относится к антителу против PD-1 или антигенсвязывающей части, как описано в настоящем описании, для применения в лечении злокачественной опухоли у пациента и/или усиления иммунитета у пациента, например, в способе лечения, описанном в настоящем описании.

Кроме того, настоящее изобретение относится к изделию, содержащему антитело против PD-1 или антигенсвязывающую часть, как описано в настоящем описании, где указанное изделие является подходящим для лечения злокачественной опухоли у пациента и/или усиления иммунитета у пациента, напри-

мер, в способе лечения, описанном в настоящем описании.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A-1D показаны репрезентативные точечные диаграммы проточной цитометрии для четырех клонов антител против PD-1, имеющих различную реакционную способность по отношению к ортологам PD-1.

На фиг. 2A-2H показано блокирование связывания PD-L1 с экспрессированным на клетках PD-1 для антител против PD-1 по изобретению.

На фиг. 3A-3F показаны кривые зависимости ответа от дозы для двенадцати антител против PD-1 в анализе цельной крови с SEB.

На фиг. 4A-4F показаны кривые зависимости ответа от дозы для двенадцати антител против PD-1 в анализе MLR (односторонней реакции смешанной культуры лимфоцитов).

На фиг. 5 показан обзор идентифицированных групп эпитопов (эпитопных групп) для тестируемых антител против PD-1 и аналогов ниволумаба и пембролизумаба. Антитела, соединенные черными линиями, проявляют перекрестную блокирующую активность. Антитела сгруппированы в соответствии с паттернами конкуренции с другими антителами против PD-1. Нивол. Nivo: аналог ниволумаба; Пемброл. Pembro: аналог пембролизумаба.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к новым антителам против PD-1 человека, которые можно использовать для усиления иммунной системы у пациента-человека, такого как пациент с злокачественной опухолью. Если не указано иное, в рамках изобретения "PD-1" относится к PD-1 человека.

Последовательность полипептида PD-1 человека является доступной в Uniprot под номером доступа Q15116 (PDCD1 HUMAN).

Термин "антитело" (Ab) или "иммуноглобулин" (Ig) в рамках изобретения относится к тетрамеру, содержащему две тяжелые (H) цепи (приблизительно 50-70 кДа) и две легкие (L) цепи (приблизительно 25 кДа), соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельного домена тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Каждая легкая цепь состоит из вариабельного домена легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Домены VH и VL можно далее подразделять на области гипервариабельности, названные "определяющими комплементарность областями" (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, названными "каркасными областями" (FR). Каждый VH и VL состоит из трех CDR (H-CDR в настоящем описании обозначает CDR из тяжелой цепи; и L-CDR в настоящем описании обозначает CDR из легкой цепи) и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Приписывание номеров аминокислот в тяжелой или легкой цепях можно осуществлять в соответствии с определениями IMG T® (Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol., 27(1):55-77 (2003)); или с определениями из Rabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 и 1991)); Chothia & Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); или Chothia et al., Nature, 342:878-883 (1989).

Термин "рекомбинантное антитело" относится к антителу, экспрессированному в клетке или линии клеток, содержащей нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующие антитело, где указанные нуклеотидная последовательность (последовательности) не ассоциированы с клеткой естественным образом.

Термин "выделенный белок", "выделенный полипептид" или "выделенное антитело" относится к белку, полипептиду или антителу, которые в силу своего происхождения или источника получения

- (1) не ассоциированы с естественным образом ассоциированными компонентами, сопровождающими их в природном состоянии;
- (2) являются свободными от других белков из того же самого вида;
- (3) экспрессированы в другом виде; и/или
- (4) не встречаются в природе.

Таким образом, полипептид, который является химически синтезированным или синтезированным в клеточной системе, отличной от клетки, из которой он происходит в природе, является "выделенным" из естественным образом ассоциированных с ним компонентов. Белок можно также сделать в основном свободным от естественным образом ассоциированных с ним компонентов посредством выделения, с использованием способов очистки белка, хорошо известных в данной области.

В рамках изобретения термин "зародышевая" относится к нуклеотидным и аминокислотным последовательностям генов и фрагментов генов антител, как они передаются от родителей к потомству через зародышевые клетки. Зародышевые последовательности отличаются от нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела в зрелых В-клетках, которые изменены посредством событий рекомбинации и гипермутации в ходе созревания В-клеток. Антитело, в котором "использована" конкретная зародышевая последовательность, имеет нуклеотидную или аминокислотную последовательность, которая выравнивается с этой зародышевой нуклеотидной последовательностью или с аминокислотной последовательностью, которую она определяет, более близко, чем с другой зародышевой нуклеотидной или аминокислотной последовательностью.

Термин "аффинность" относится к показателю привлечения антигена и антитела. Присущую антителу привлекательность для антигена, как правило, выражают в форме равновесной константы аффинности связывания (K_D) для конкретного взаимодействия антитело-антиген. Говорят, что антитело специфически связывается с антигеном, когда K_D составляет ≤ 1 мМ, предпочтительно, ≤ 100 нМ. Константу аффинности связывания K_D можно измерять, например, посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (BIAcore™) или интерферометрия биослоя, например, с использованием системы IBIS MX96 SPR от IBIS Technologies, системы ProteOn™ XPR36 SPR из Bio-Rad, или системы Octet™ из ForteBio.

Термин " k_{off} " относится к константе скорости диссоциации для конкретного взаимодействия антитело - антиген. Константу скорости диссоциации k_{off} можно измерять посредством SPR или интерферометрия биослоя, например, с использованием одной из систем, перечисленных выше.

Термин "эпитоп" в рамках изобретения относится к части (детерминанте) антигена, которая специфически связывается с антителом или родственной молекулой, такой как биспецифическая связывающая молекула. Эпитопные детерминанты, как правило, состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как боковые цепи аминокислот или углевода, или сахара, и как правило, имеют специфические трехмерные структурные характеристики, так же как специфические характеристики заряда. Эпитоп может являться "линейным" или "конформационным". В линейном эпитопе все точки взаимодействия между белком (например, антигеном) и взаимодействующей молекулой (такой как антителом) встречаются линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка. В конформационном эпитопе точки взаимодействия встречаются среди аминокислотных остатков на белке, которые отделены друг от друга в первичной аминокислотной последовательности. После определения желательного эпитопа на антигене можно получать антитела против этого эпитопа с использованием способов, хорошо известных в данной области. Например, антитело против линейного эпитопа можно получать, например, посредством иммунизации животного пептидом, имеющим аминокислотные остатки линейного эпитопа. Антитело против конформационного эпитопа можно получать, например, посредством иммунизации животного мини-доменом, содержащим соответствующие аминокислотные остатки конформационного эпитопа. Антитело против конкретного эпитопа можно также получать, например, посредством иммунизации животного представляющей интерес молекулой-мишенью (например, PD-1) или ее соответствующей частью, затем скрининга по связыванию с эпитопом.

Можно определять, связывается ли антитело с тем же самым эпитопом, что и антитело против PD-1 по изобретению, или конкурирует ли антитело за связывание с антителом против PD-1 по изобретению, с использованием способов, известных в данной области, включая без ограничения анализы конкуренции, группировку эпитопов и аланиновое сканирование. В некоторых вариантах осуществления тестируемое антитело и антитело против PD-1 по изобретению связывают по меньшей мере один общий остаток (например, по меньшей мере два, три, четыре, пять или шесть общих остатков) на PD-1. В следующих вариантах осуществления контактные остатки на PD-1 являются полностью идентичными между тестируемым антителом и антителом против PD-1 по изобретению. В одном варианте осуществления антителу против PD-1 по изобретению позволяют связываться с PD-1 в условиях насыщения, и затем измеряют способность тестируемого антитела связываться с PD-1. Если тестируемое антитело является способным связываться с PD-1 в то же самое время, что и эталонное антитело против PD-1, тогда тестируемое антитело связывается с эпитопом, отличным от эпитопа эталонного антитела против PD-1. Однако, если тестируемое антитело неспособно связываться с PD-1 в то же самое время, тогда тестируемое антитело связывается с таким же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или эпитопом, находящимся в непосредственной близости от эпитопа, связываемого антителом против PD-1 по изобретению. Этот эксперимент можно проводить с использованием, например, ELISA, RIA, BIACORE™, SPR, интерферометрии биослоя или проточной цитометрии. Чтобы тестировать, проявляет ли антитело против PD-1 перекрестную конкуренцию с другим антителом против PD-1, можно использовать способ конкуренции, описанный выше, в двух направлениях, т.е. определяя, блокирует ли известное антитело тестируемое антитело и наоборот. Такие эксперименты перекрестной конкуренции можно проводить, например, с использованием устройства IBIS MX96 SPR или системы Octet™.

В определенных случаях, может также являться желательным изменение одного или нескольких аминокислотных остатков CDR для улучшения аффинности связывания с эпитопом-мишенью. Это известно как "аффинное созревание" и может необязательно быть проведено в сочетании с гуманизацией, например, в ситуациях, когда гуманизация антитела приводит к уменьшению специфичности или аффинности связывания, и не является возможным достаточное улучшение специфичности или аффинности связывания только посредством обратного мутагенеза. Различные способы аффинного созревания известны в данной области, например, способ сканирующего насыщающего мутагенеза *in vitro*, описанный в Burks et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 94:412-417 (1997), и способ ступенчатого аффинного созревания *in vitro* из Wu et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95:6037-6042 (1998).

В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению могут являться химерными, гуманизированными или полностью человеческий. Несмотря на то что невозможно точно прогнозировать иммуногенность конкретного лекарственного средства на основе антител, не относящихся к человеку

антитела проявляют тенденцию к большей иммуногенности для человека, чем человеческие антитела. Показано, что химерные антитела, в которых чужеродные (например, из грызунов или птиц) константные области заменены на последовательности человеческого происхождения, в общем являются менее иммуногенными, чем антитела полностью чужеродного происхождения. Тенденция для терапевтических антител направлена в сторону гуманизированных или полностью человеческих антител.

Термин "химерное антитело" относится к антителу, содержащему последовательности из двух различных видов животных. Например, химерное антитело может содержать переменные домены из мышиного антитела (т.е. антитела, кодированного мышиными генами антител, такого как антитело, полученное из иммунизированной мыши с использованием технологии гибридомы), связанные с константными областями из антитела из другого вида (например, человека, кролика или крысы). В случае химерного антитела, не относящегося к человеку части можно подвергать дополнительному изменению для гуманизации антитела.

Термин "гуманизировать" относится к модификации антитела, полностью или частично происходящего из не относящегося к человеку источника (например, мышиного или куриного антитела, полученного посредством иммунизации мышей или кур, соответственно, представляющим интерес антигеном, или химерного антитела на основе такого мышиного или куриного антитела), посредством замены определенных аминокислотных последовательностей, в частности, в каркасных областях (FR) и константных областях тяжелых и легких цепей, на соответствующие аминокислотные последовательности человеческих FR и константных областей, для исключения или минимизации ответа антител против лекарственного средства у пациентов-людей. Антитела из не относящегося к человеку источника, таким образом, можно гуманизировать для уменьшения риска ответа человеческих антител против лекарственного средства.

Термин "человеческое антитело" относится к антителу, в котором последовательности переменного домена и константной области происходят из человеческих последовательностей. Термин включает антитела с последовательностями, происходящими из человеческих генов, которые были модифицированы, например, для уменьшения иммуногенности, увеличения аффинности и/или увеличения стабильности. Кроме того, термин включает антитела, полученные рекомбинантным способом в не относящихся к человеку клетках, которые могут подвергаться гликозилированию, не типичному для клеток человека. Термин включает также антитела, продуцированные трансгенными не относящимися к человеку организмами с человеческими генами антител (например, крысами OmniRat®).

Термин "антигенсвязывающая часть" антитела (или просто "часть антитела"), в рамках изобретения относится к одной или нескольким частям или фрагментам антител, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, с PD-1 человека или его частью). Показано, что определенные фрагменты полноразмерного антитела могут осуществлять антигенсвязывающую функцию антитела. Примеры связывающих фрагментов, охваченных термином "антигенсвязывающая часть", включают

- (i) фрагмент Fab: моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1;
- (ii) фрагмент F(ab')₂: двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области;
- (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1;
- (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела;
- (v) фрагмент dAb, состоящий из домена VH; и
- (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR), способные специфически связываться с антигеном.

Кроме того, несмотря на то что два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодированы отдельными генами, их можно соединять, с использованием рекомбинантных способов, посредством синтетического линкера, позволяющего получать из в форме одиночной белковой цепи, в которой домены VL и VH спарены с формированием моновалентной молекулы (известной как одноцепочечное Fv (scFv)). В изобретение включены также антигенсвязывающие молекулы, содержащие VH и/или VL. В случае VH молекула может также содержать одну или несколько из областей CH1, шарнира, CH2 или CH3. Такие одноцепочечные антитела также предназначены для включения в термин "антигенсвязывающая часть" антитела. Другие формы одноцепочечных антител, таких как диатела, также включены. Диатела представляют собой двухвалентные, биспецифические антитела, в которых домены VH и VL экспрессированы на одной полипептидной цепи, но с использованием линкера, который является слишком коротким, чтобы позволять спаривание между двумя доменами в одной и той же цепи, таким образом, вынуждая домены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и образовывать два антигенсвязывающих участка.

Части антител, такие как фрагменты Fab и F(ab')₂, можно получать из полноразмерных антител с использованием общепринятых способов, таких как расщепление полноразмерных антител папаином или пепсином. Кроме того, антитела, части антител и молекулы иммуноадгезии можно получать с использованием стандартных способов рекомбинантной ДНК, например, как описано в настоящем описании.

Класс (изотип) и подкласс антител против PD-1 можно определять любым способом, известным в данной области. Как правило, класс и подкласс антитела можно определять с использованием антител,

специфических для конкретного класса и подкласса антитела. Такие антитела являются коммерчески доступными. Класс и подкласс можно определять посредством ELISA, вестерн-блоттинга, также как других способов. Альтернативно класс и подкласс можно определять посредством секвенирования всех или части константных областей тяжелых и/или легких цепей антител, сравнения их аминокислотных последовательностей с известными аминокислотными последовательностями различных классов и подклассов иммуноглобулинов, и определения класса и подкласса антител.

При ссылке на конкретные аминокислотные остатки в данном положении последовательности антитела, обозначение, например, "35S", относится к положению и остатку, т.е. в этом случае показывает, что остаток серина (S) присутствует в положении 35 последовательности. Подобным образом, обозначение, например, "13Q+35S", относится к двум остаткам в соответствующих положениях. Если не указано иное, все номера аминокислотных остатков антитела, на которые ссылаются в настоящем описании, представляют собой остатки в соответствии со схемой нумерации IMGT®.

Антитела против PD-1.

Настоящее изобретение относится к антителам, нацеленным против PD-1, и к их антигенсвязывающим частям. В конкретном варианте осуществления антитела, описанные в настоящем описании, представляют собой человеческие антитела, например, полученные из трансгенных крыс с генами человеческих антител. В конкретных вариантах осуществления человеческие антитела могут содержать определенные мутации, например, для возвращения посредством мутагенеза происходящих из праймеров мутаций к зародышевой последовательности (см., например, "Symplex-корректированный" вариант последовательности ниже) или для возвращения посредством мутагенеза каркасных областей к наиболее близкой зародышевой последовательности V или J (см., например, "приближенный к зародышевому" вариант последовательности ниже).

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 выбрано из группы, состоящей из

- a) антитела, H-CDR1-3 которого содержат аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 29-31 соответственно;
- b) антитела, варибельный домен тяжелой цепи (VH) которого является по меньшей мере на 90% идентичным по последовательности аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 1;
- c) антитела, VH которого содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1;
- d) антитела, тяжелая цепь (HC) которого содержит аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 1 и 26;
- e) антитела, L-CDR1-3 которого содержат аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 32-34 соответственно;
- f) антитела, варибельный домен легкой цепи (VL) которого является по меньшей мере на 90% идентичным по последовательности аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 2;
- g) антитела, VL которого содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2;
- h) антитела, легкая цепь (LC) которого содержит аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 2 и 28;
- i) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого содержат аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 29-34 соответственно;
- j) антитела, VH которого является по меньшей мере на 90% идентичным по последовательности аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 1, и VL которого является по меньшей мере на 90% идентичным по последовательности аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 2;
- k) антитела, VH которого содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1 и VL которого содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2; и
- l) антитела, HC которого содержит аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 1 и 26 и LC которого содержит аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 2 и 28.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 выбрано из группы, состоящей из

- a) антитела, H-CDR1-3 которого содержат аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 35-37 соответственно;
- b) антитела, варибельный домен тяжелой цепи (VH) которого является по меньшей мере на 90% идентичным по последовательности аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 3;
- c) антитела, VH которого содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3;
- d) антитела, тяжелая цепь (HC) которого содержит аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 3 и 26;
- e) антитела, L-CDR1-3 которого содержат аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 38-40 соответственно;
- f) антитела, варибельный домен легкой цепи (VL) которого является по меньшей мере на 90% идентичным по последовательности аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 4;
- g) антитела, VL которого содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4;
- h) антитела, легкая цепь (LC) которого содержит аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 4 и 28;
- i) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого содержат аминокислотные последовательности из

В других вариантах осуществления антитело против PD-1 имеет VH и VL, которые являются по меньшей мере на 90% идентичными по аминокислотной последовательности VH и VL соответственно, любого из антител 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 и 18483, например, по меньшей мере на 92, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичными по последовательности VH и VL любого из указанных антител. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая часть антитела против PD-1 имеет указанные VH и VL.

В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 имеет VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности VH и VL, соответственно, любого из антител 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 и 18483. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая часть антитела против PD-1 имеет указанные VH и VL.

В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть по изобретению содержит аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 из

- a) SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33 и 34 соответственно;
- b) SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 и 40 соответственно;
- c) SEQ ID NO: 41, 42, 43, 44, 45 и 46 соответственно;
- d) SEQ ID NO: 29, 47, 48, 49, 50 и 51 соответственно;
- e) SEQ ID NO: 52, 53, 54, 38, 45 и 55 соответственно;
- f) SEQ ID NO: 29, 56, 48, 57, 33 и 51 соответственно;
- g) SEQ ID NO: 58, 59, 60, 57, 33 и 34 соответственно;
- h) SEQ ID NO: 61, 62, 43, 44, 45 и 46 соответственно;
- i) SEQ ID NO: 63, 64, 65, 32, 33 и 34 соответственно;
- j) SEQ ID NO: 66, 67, 68, 38, 45 и 55 соответственно;
- k) SEQ ID NO: 69, 70, 71, 72, 45 и 73 соответственно; или
- l) SEQ ID NO: 74, 75, 76, 57, 33 и 34 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть по изобретению содержит VH и VL, которые являются на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичными аминокислотным последовательностям из

- a) SEQ ID NO: 1 и 2 соответственно;
- b) SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно;
- c) SEQ ID NO: 5 и 6 соответственно;
- d) SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно;
- e) SEQ ID NO: 9 и 10 соответственно;
- f) SEQ ID NO: 11 и 12 соответственно;
- g) SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно;
- h) SEQ ID NO: 15 и 16 соответственно;
- i) SEQ ID NO: 17 и 18 соответственно;
- j) SEQ ID NO: 19 и 20 соответственно;
- k) SEQ ID NO: 21 и 22 соответственно; или
- l) SEQ ID NO: 23 и 24 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть по изобретению содержит VH и VL, имеющие аминокислотные последовательности из

- a) SEQ ID NO: 1 и 2 соответственно;
- b) SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно;
- c) SEQ ID NO: 5 и 6 соответственно;
- d) SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно;
- e) SEQ ID NO: 9 и 10 соответственно;
- f) SEQ ID NO: 11 и 12 соответственно;
- g) SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно;
- h) SEQ ID NO: 15 и 16 соответственно;
- i) SEQ ID NO: 17 и 18 соответственно;
- j) SEQ ID NO: 19 и 20 соответственно;
- k) SEQ ID NO: 21 и 22 соответственно; или
- l) SEQ ID NO: 23 и 24 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 содержит

- a) HC с аминокислотными последовательностями из SEQ ID NO: 1 и 26 и LC с аминокислотными последовательностями из SEQ ID NO: 2 и 28;
- b) HC с аминокислотными последовательностями из SEQ ID NO: 3 и 26 и LC с аминокислотными последовательностями из SEQ ID NO: 4 и 28;
- c) HC с аминокислотными последовательностями из SEQ ID NO: 5 и 26 и LC с аминокислотными последовательностями из SEQ ID NO: 6 и 28;
- d) HC с аминокислотными последовательностями из SEQ ID NO: 7 и 26 и LC с аминокислотными последовательностями из SEQ ID NO: 8 и 28;

ность из SEQ ID NO: 21, где X в положении 48 представляет собой V и/или X в положении 50 представляет собой A. VL может содержать аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 22, где X в положении 4 представляет собой M. В конкретных вариантах осуществления VL может также содержать аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 22, где X в положении 12 представляет собой S.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 имеет VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности VH и VL соответственно, из антитела 18483, т.е. где VH содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 23 и VL содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 24. В этом варианте осуществления VH может содержать аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 23, где X в положении 1 представляет собой E, X в положении 5 представляет собой V и/или X в положении 6 представляет собой E. В некоторых вариантах осуществления VL содержит E в положении 1, V в положении 5 и E в положении 6. В конкретных вариантах осуществления VH может также содержать аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 23, где X в положении 35 представляет собой S. VL может содержать аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 24, где X в положении 3 представляет собой V. В конкретных вариантах осуществления VL может также содержать аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 24, где X в положении 40 представляет собой A и/или X в положении 55 представляет собой Y.

В конкретных вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть содержит аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 из антитела, выбранного из 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 и 18483, и кроме того, в нем используют такие же зародышевые последовательности тяжелой и/или легкой цепей, как отобранное антитело.

В конкретных вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть содержит аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 из антитела, выбранного из 18040, 18049, 18098, 18113, 18201, 18247, 18250, 18325, 18366, 18400, 18413 и 18483, и дополнительно содержит каркасные области (FR), которые являются на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичными FR отобранного антитела.

В некоторых вариантах осуществления любое из антител против PD-1 или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящем описании, может ингибировать связывание PD-L1, или PD-L2, или обоих с PD-1.

В некоторых вариантах осуществления любое из антител против PD-1 или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящем описании, может иметь по меньшей мере одно из следующих свойств:

- связывается с PD-1 яванского макака с K_D , например, 4×10^{-8} М или менее;
- связывается с PD-1 мыши с K_D , например, 2×10^{-8} М или менее;
- связывается с PD-1 человека с K_D 3×10^{-9} М или менее;
- ингибирует взаимодействие PD-1 с PD-L1 в концентрации 10 мкг/мл;
- стимулирует продукцию IL-2 в анализе цельной крови с SEB; и
- стимулирует продукцию IFN- γ в анализе односторонней реакции смешанной культуры лимфоцитов.

В некоторых вариантах осуществления любое из антител против PD1 или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящем описании, может связываться с PD-1 человека с K_D 5×10^{-9} М или менее, 4×10^{-9} М или менее, 3×10^{-9} М или менее, 2×10^{-9} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 9×10^{-10} М или менее, 8×10^{-10} М или менее, 7×10^{-10} М или менее, 6×10^{-10} М или менее, 5×10^{-10} М или менее, 4×10^{-10} М или менее, 3×10^{-10} М или менее, 2×10^{-10} М или менее или 1×10^{-10} М или менее. В конкретных вариантах осуществления K_D определяют с использованием поверхностного плазмонного резонанса.

В некоторых вариантах осуществления любое из антител против PD1 или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящем описании, может ингибировать взаимодействие PD-1 с PD-L1 в концентрации 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мкг/мл.

Класс антитела против PD-1, полученного способами, описанными в настоящем описании, можно менять или переключать на другой класс или подкласс. В одном аспекте изобретения молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую VL или VH, выделяют с использованием способов, хорошо известных в данной области, так что она не включает последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CL или CH. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие VL или VH, затем функционально связывают с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей CL или CH, соответственно, из другого класса молекул иммуноглобулинов. Это можно осуществлять с использованием вектора или молекулы нуклеиновой кислоты, содержащих цепь CL или CH, как описано выше. Например, класс антитела против PD-1, исходно представляющего собой IgM, можно переключать на класс IgG. Кроме того, переключение классов можно использовать для перевода одного подкласса IgG в другой, например, из IgG1 в IgG2. Константную область легкой цепи можно изменять, например, на константную область легкой цепи A. Предпочтительный способ получения антитела по изобретению с желательным изотипом Ig, включает стадии выделения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела против PD-1, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь антитела против PD-1, получения переменного домена тяжелой цепи, лигирования переменного домена тяжелой цепи с константной областью

тяжелой цепи желательного изотипа, экспрессии легкой цепи и лигированной тяжелой цепи в клетке, и сбора антитела против PD-1 с желательным изотипом.

Антитело против PD-1 по изобретению может представлять собой молекулу IgG, IgM, IgE, IgA или IgD, но, как правило, принадлежит к изотипу IgG, например IgG подкласса IgG1, IgG2a или IgG2b, IgG3 или IgG4. В одном варианте осуществления антитело представляет собой IgG1. В другом варианте осуществления антитело представляет собой IgG4.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 может содержать по меньшей мере одну мутацию в области Fc. Известен ряд различных мутаций Fc, где эти мутации обеспечивают измененную эффекторную функцию. Например, во многих случаях может являться желательным уменьшение или прекращение эффекторной функции, например, когда взаимодействия лиганд/рецептор являются нежелательными, или в случае конъюгатов антитело-лекарственное средство.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 содержит по меньшей мере одну мутацию в области Fc, уменьшающую эффекторную функцию. Положения аминокислот области Fc, которые могут являться преимущественными для мутации, чтобы уменьшать эффекторную функцию, включают одно или несколько из положений 228, 233, 234 и 235, где положения аминокислот пронумерованы в соответствии со схемой нумерации IMGT.

В одном варианте осуществления один или оба из аминокислотных остатков в положениях 234 и 235 можно подвергать мутагенезу, например, от Leu до Ala (L234A/L235A). Эти мутации уменьшают эффекторную функцию области Fc из антител IgG1. Дополнительно или альтернативно аминокислотный остаток в положении 228 можно подвергать мутагенезу, например, до Pro. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток в положении 233 можно подвергать мутагенезу, например, до Pro, аминокислотный остаток в положении 234 можно подвергать мутагенезу, например, до Val, и/или аминокислотный остаток в положении 235 можно подвергать мутагенезу, например, до Ala. Положения аминокислот пронумерованы в соответствии со схемой нумерации IMGT®.

В некоторых вариантах осуществления, где антитело принадлежит к подклассу IgG4, оно может содержать мутацию S228P, т.е. иметь пролин в положении 228, где положение аминокислоты пронумеровано в соответствии со схемой нумерации IMGT®. Известно, что эта мутация уменьшает нежелательный обмен плеч Fab.

В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть по изобретению может являться частью более крупной молекулы иммуноадгезии, сформированной посредством ковалентной или нековалентной ассоциации антитела или части антитела с одним или несколькими другими белками или пептидами. Примеры таких молекул иммуноадгезии включают использование коровой области стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov et al., *Human Antibodies and Hybridomas*, 6:93-101 (1995)) и использование остатка цистеина, маркерного пептида и C-концевой полигистидиновой метки для получения двухвалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov et al., *Mol. Immunol.*, 31:1047-1058 (1994)). Другие примеры включают случаи, когда одну или несколько CDR из антитела встраивают в молекулу либо ковалентно, либо нековалентно, для получения иммуноадгезина, специфически связывающегося с представляющим интерес антигеном. В таких вариантах осуществления, CDR(несколько CDR) можно включать в качестве части более крупной полипептидной цепи, можно ковалентно связывать с другой полипептидной цепью, или можно встраивать нековалентно.

В другом варианте осуществления можно получать слитое антитело или иммуноадгезин, содержащие все или часть антитела против PD-1 по изобретению, связанные с другим полипептидом. В конкретных вариантах осуществления только вариабельные домены антитела против PD-1 связаны с полипептидом. В конкретных вариантах осуществления домен VH антитела против PD-1 связан с первым полипептидом, в то время как домен VL из антитела против PD-1 связан с вторым полипептидом, ассоциированным с первым полипептидом таким образом, что домены VH и VL могут взаимодействовать друг с другом с формированием антигенсвязывающего участка. В другом предпочтительном варианте осуществления, домен VH отделен от домена VL посредством линкера, такого что домены VH и VL могут взаимодействовать друг с другом (например, одноцепочечные антитела). Затем антитело VH-линкер-VL связываются с представляющим интерес полипептидом. Кроме того, можно получать слитые антитела, в которых два (или более) одноцепочечных антител связаны друг с другом. Это можно использовать, если желательно получить двухвалентное или поливалентное антитело на одной полипептидной цепи, или если желательно получить биспецифическое антитело.

Для получения одноцепочечного антитела (scFv), кодирующие VH и VL фрагменты ДНК функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность (Gly4 Ser)3 (SEQ ID NO: 115), таким образом, что последовательности VH и VL можно экспрессировать в форме непрерывного одноцепочечного белка, с доменами VL и VH, соединенными гибким линкером. См., например, Bird et al., *Science*, 242:423, 426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85:5879, 5883 (1988); и McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). Одноцепочечное антитело может являться моновалентным, если используют только одиночные VH и VL; двухвалентным, если используют два VH и VL; или поливалентным, если используют более двух VH и VL.

Например, можно получать биспецифические или поливалентные антитела, которые специфически связываются с PD-1 человека и с другой молекулой.

В других вариантах осуществления другие модифицированные антитела можно получать с использованием кодирующих антител против PD-1 молекул нуклеиновой кислоты. Например, "каппа-антитела" (Ill et al., *Protein Eng.*, 10:949-57 (1997)), "миниантитела" (Martin et al., *EMBO J.*, 13:5303-9 (1994)), "диатела" (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:6444-6448 (1993)) или "янусины" (Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991); и Traunecker et al., *Int. J. Cancer (Suppl.)*, 7:51-52 (1992)) можно получать с использованием стандартных способов молекулярной биологии, следуя объяснениям в описании.

Антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть по изобретению можно дериватизировать или связывать с другой молекулой (например, другим пептидом или белком). Как правило, антитела или их части дериватизируют таким образом, что на связывание PD-1 не оказывает неблагоприятного влияния дериватизация или мечение. Соответственно антитела и части антител по изобретению предназначены для включения как интактных, так и модифицированных форм человеческих антител против PD-1, описанных в настоящем описании. Например, антитело или часть антитела по изобретению можно функционально связывать (посредством химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или несколькими другими видами молекул, такими как другое антитело (например, биспецифическое антитело или диатело), средство для детекции, лекарственное средство, и/или белок или пептид, которые могут опосредовать ассоциацию антитела или части антитела с другой молекулой (такой как коровая область стрептавидина или полигистидиновая метка).

Один тип дериватизированного антитела получают посредством перекрестного сшивания двух или более антител (одного и того же типа или различных типов, например, для получения биспецифических антител). Пригодные сшивающие средства включают средства, которые являются гетеробифункциональными, имеющими две отдельные реакционноспособные группы, разделенные подходящим спейсером (например, сложный эфир м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид) или гомобифункциональными (например, дисукцинимидилсуберат). Такие линкеры являются доступными, например, из Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Антитело против PD-1 можно также дериватизировать с использованием химической группы, такой как полиэтиленгликоль (PEG), метильная или этильная группа, или углеводная группа. Эти группы можно использовать для улучшения биологических характеристик антитела, например, для увеличения времени полужизни в сыворотке.

Антитело в соответствии с настоящим изобретением может также являться меченым. В рамках изобретения термины "метка" или "меченый" относятся к встраиванию другой молекулы в антитело. В одном варианте осуществления метка представляет собой поддающийся детекции маркер, например вставку радиоактивно меченой аминокислоты или присоединение к полипептиду биотинилированных групп, которые можно детектировать посредством меченого авидина (например, стрептавидина, имеющего флуоресцентный маркер или ферментную активность, которые можно детектировать оптическими или колориметрическими способами). В другом варианте осуществления метка или маркер могут являться терапевтическими, например, представлять собой конъюгат лекарственного средства или токсина. Различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов известны в данной области и могут быть использованы. Примеры меток для полипептидов включают, но без ограничения следующие: радиоактивные изотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, лантанид фосфора), ферментные метки (например, пероксидаза хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные маркеры, биотинильные группы, predeterminedенные полипептидные эпитопы, узнаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновых молний, участки связывания для вторичных антител, металлсвязывающие домены, эпитопные метки), магнитные средства, такие как хелаты гадолиния, токсины, такие как коклюшный токсин, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацидин, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, татракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин, а также их аналоги или гомологи. В некоторых вариантах осуществления метки присоединяют при помощи плеч спейсеров разной длины для уменьшения возможного стерического несоответствия.

В конкретных вариантах осуществления антитела по изобретению могут находиться в нейтральной форме (включая цвиттер-ионные формы) или в форме положительно или отрицательно заряженных молекул. В некоторых вариантах осуществления антитела можно включать в комплекс с противоионом для формирования фармацевтически приемлемой соли.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к комплексу, содержащему одно или несколько антител и один или несколько противоионов, где противоионы происходят из фармацевтически приемлемых неорганических и органических кислот и оснований.

Биспецифические связывающие молекулы.

В следующем аспекте изобретение относится к биспецифической связывающей молекуле, имеющей

специфичность связывания антитела против PD-1, описанного в настоящем описании, и специфичность связывания другого антитела против PD-1 (например, другого антитела против PD-1, описанного в настоящем описании) или антитела, нацеленного на отличный белок, такой как другой белок иммунной контрольной точки, антиген злокачественной опухоли, или другая молекула поверхности клетки, активность которой опосредует состояние заболевания, такое как злокачественную опухоль. Такие биспецифические связывающие молекулы известны в данной области, и примеры различных типов биспецифических связывающих молекул приведены в другом месте настоящего описания.

Молекулы нуклеиновой кислоты и векторы.

Настоящее изобретение также относится к молекулам и последовательностям нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела против PD-1 или их антигенсвязывающие части, описанные в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления различные молекулы нуклеиновой кислоты кодируют аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи антитела против PD-1 или его антигенсвязывающей части. В других вариантах осуществления одна и та же молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи антитела против PD-1 или его антигенсвязывающей части.

Ссылка на нуклеотидную последовательность включает комплементарную ей последовательность, если не указано иное. Таким образом, ссылку на нуклеиновую кислоту, имеющую конкретную последовательность, следует понимать, как включающую комплементарную ей цепь, с комплементарной ей последовательностью. Термин "полинуклеотид", в рамках изобретения обозначает полимерную форму нуклеотидов длиной по меньшей мере 10 оснований, либо рибонуклеотидов, либо дезоксирибонуклеотидов, либо модифицированную форму любого типа нуклеотида. Термин включает одно- и двухцепочечные формы.

В любом из вышеуказанных вариантов осуществления, молекулы нуклеиновой кислоты могут являться выделенными.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к вектору, пригодному для экспрессии одной из цепей антитела или его антигенсвязывающей части, как описано в настоящем описании. Термин "вектор" в рамках изобретения обозначает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой плазмиду, т.е. кольцевой двухцепочечный фрагмент ДНК, в который можно лигировать дополнительные фрагменты ДНК. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор, где дополнительные фрагменты ДНК можно лигировать в вирусный геном. В некоторых вариантах осуществления векторы являются способными к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомные векторы для млекопитающих). В других вариантах осуществления векторы (например, неэписомные векторы для млекопитающих) могут интегрироваться в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Кроме того, конкретные векторы являются способными управлять экспрессией генов, которыми они функционально связаны. Такие векторы обозначены в настоящем описании как "рекомбинантные экспрессирующие векторы" (или просто "экспрессирующие векторы").

Изобретение относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие тяжелую цепь антитела против PD-1 по изобретению или его антигенсвязывающей части, легкую цепь антитела против PD-1 по изобретению или его антигенсвязывающей части или как тяжелую, так и легкую цепи антитела против PD-1 по изобретению или его антигенсвязывающей части. Изобретение, кроме того, относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие слитые белки, модифицированные антитела, фрагменты антител и зонды для них.

Молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую и/или легкую цепи антитела против PD-1 или его антигенсвязывающей части по изобретению, можно выделять из любого источника, продуцирующего такое антитело или часть. В различных вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты выделяют из В-клеток, экспрессирующих антитело против PD-1, выделенных из животного, иммунизированного антигеном PD-1 человека, или из иммортализованной клетки, полученной из такой В-клетки. Способы выделения нуклеиновых кислот, кодирующих антитело, хорошо известны в данной области. мРНК можно выделять и использовать для получения кДНК для использования в полимеразной цепной реакции (ПЦР) или клонировании кДНК генов антитела. В конкретных вариантах осуществления молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению можно синтезировать, а не выделять.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты по изобретению может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую домен VH из антитела против PD-1 или антигенсвязывающей части по изобретению, соединенную в рамке считывания с нуклеотидной последовательностью, кодирующей константную область тяжелой цепи из любого источника. Подобным образом молекула нуклеиновой кислоты по изобретению может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую домен VL из антитела против PD-1 или антигенсвязывающей части по изобретению, соединенную в рамке считывания с нуклеотидной последовательностью, кодирующей константную область легкой цепи из любого источника.

В следующем аспекте изобретения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие переменный

домен тяжелой (VH) и/или легкой (VL) цепей, можно "конвертировать" в гены полноразмерного антитела. В одном варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие домены VH или VL, конвертируют в гены полноразмерного антитела посредством вставки в экспрессирующий вектор, уже кодирующий константные области тяжелой цепи (CH) или константные области легкой цепи (CL), соответственно, таким образом, что фрагмент VH функционально связан с фрагментом(фрагментами) CH в векторе, и/или фрагмент VL функционально связан с фрагментом CL в векторе. В другом варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие домены VH и/или VL, конвертируют в гены полноразмерного антитела посредством связывания, например лигирования, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей домены VH и/или VL, с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей область CH и/или CL, с использованием стандартных способов молекулярной биологии. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полноразмерные тяжелые и/или легкие цепи, можно затем экспрессировать в клетке, в которую они введены, и выделять антитело против PD-1.

Молекулы нуклеиновой кислоты можно использовать для рекомбинантной экспрессии больших количеств антител против PD-1. Молекулы нуклеиновой кислоты можно также использовать для продукции химерных антител, биспецифических антител, одноцепочечных антител, иммуноадгезинов, диател, мутантных антител и производных антител, как описано в настоящем описании.

В другом варианте осуществления молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению используют в качестве зонда или праймера для ПЦР для специфической последовательности антитела. Например, нуклеиновую кислоту можно использовать в качестве зонда в диагностических способах или в качестве праймера для ПЦР для амплификации областей ДНК, которые можно использовать, среди прочего, для выделения дополнительных молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих переменные домены антител против PD-1. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты представляют собой олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды происходят из высокопеременных доменов тяжелых и легких цепей представляющего интерес антитела. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды кодируют все или часть одной или нескольких из CDR антител против PD-1 или их антигенсвязывающих частей по изобретению, как описано в настоящем описании.

В другом варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты и векторы можно использовать для получения мутантных антител против PD-1. Антитела можно подвергать мутагенезу в переменных доменах тяжелых и/или легких цепей, например, для изменения свойств связывания антитела. Например, мутацию можно вводить в одну или несколько из CDR для увеличения или уменьшения K_D антитела против PD-1, для увеличения или уменьшения k_{off} или для изменения специфичности связывания антитела. В другом варианте осуществления одну или несколько мутаций вводят в аминокислотный остаток, как известно, измененный по сравнению с зародышевым в моноклональном антителе по изобретению. Мутации можно вводить в CDR или каркасную область переменного домена, или в константную область. В предпочтительном варианте осуществления мутации вводят в переменный домен. В некоторых вариантах осуществления одну или несколько мутаций вводят в аминокислотный остаток, как известно, измененный по сравнению с зародышевым в CDR или каркасной области переменного домена из антитела или его антигенсвязывающей части по изобретению.

В другом варианте осуществления каркасную область(области) подвергают мутагенезу таким образом, чтобы полученные каркасная область(области) имели аминокислотную последовательность соответствующего зародышевого гена. Мутации можно вводить в каркасную область или константную область для увеличения времени полужизни антитела против PD-1. См., например, публикацию PCT WO 00/09560. Мутацию можно вводить в каркасную область или константную область для изменения иммуногенности антитела и/или для предоставления участка для ковалентного или нековалентного связывания с другой молекулой. В соответствии с изобретением отдельное антитело может иметь мутации в любых одной или нескольких из CDR или каркасных областей переменного домена, или в константной области.

В некоторых вариантах осуществления антитела против PD-1 по изобретению или их антигенсвязывающие части экспрессируют посредством вставки ДНК, кодирующих частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, полученные, как описано выше, в экспрессирующие векторы, таким образом, что гены являются функционально связанными с необходимыми последовательностями для контроля экспрессии, такими как последовательности для контроля транскрипции и трансляции. Экспрессирующие векторы включают плазмиды, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), вирусы растений, такие как вирус мозаики цветной капусты, вирус табачной мозаики, космиды, YAC, происходящие из EBV эписомы и т.п. Кодирующую антитело последовательность можно лигировать в вектор таким образом, что последовательности для контроля транскрипции и трансляции в векторе выполняют предназначенную для них функцию регуляции транскрипции и трансляции кодирующей антитело последовательности. Экспрессирующий вектор и последовательности для контроля экспрессии можно выбирать, чтобы они являлись совместимым с используемой для экспрессии клеткой-хозяином. Кодирующую легкую цепь антитела последовательность и кодирующую тяжелую цепь антитела последовательность можно вставлять в отдельные векторы, и можно функционально связывать с одинаковыми или различными последовательностями для контроля экспрессии (например, промоторами). В одном варианте осуществления обе кодирующие последовательности вставлены в один и тот же экспресси-

рующей вектор и могут являться функционально связанными с одними и теми же последовательностями для контроля экспрессии (например, общим промотором) с отдельными идентичными последовательностями для контроля экспрессии (например, промоторами) или с различными последовательностями для контроля экспрессии (например, промоторами). Кодированные антитела последовательности можно вставлять в экспрессирующий вектор стандартными способами (например, посредством лигирования комплементарных участков рестрикции в фрагменте гена антитела и в векторе, или посредством лигирования тупых концов, если участков рестрикции не присутствует).

Удобным вектором является вектор, кодирующий функционально полную последовательность СН или СL иммуноглобулина человека, с подходящими участками рестрикции, сконструированными таким образом, что любую последовательность VH или VL можно легко вставлять и экспрессировать, как описано выше. Кодированные HC и LC гены в таких векторах могут содержать интронные последовательности, что может приводить к улучшенным общим выходам белка антитела посредством стабилизации родственных мРНК. Интронные последовательности фланкированы донорными и акцепторными участками сплайсинга, определяющими, где может происходить сплайсинг РНК. Локализация интронных последовательностей может находиться либо в переменных, либо в константных областях цепей антитела, либо как в переменных, так и в константных областях при использовании множества интронов. Полиаденилирование и терминация транскрипции может происходить в нативных хромосомных участках ниже кодирующих областей. Рекombинантный экспрессирующий вектор может также кодировать сигнальный пептид, облегчающий секрецию цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела можно клонировать в вектор таким образом, что сигнальный пептид связан с аминоконцом цепи иммуноглобулина. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид из не относящегося к иммуноглобулину белка).

В дополнение к генам цепей антитела, рекombинантные экспрессирующие векторы по изобретению могут нести регуляторные последовательности, контролирующие экспрессию генов цепей антитела в клетке-хозяине. Специалисту в данной области понятно, что дизайн экспрессирующего вектора, включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, уровень экспрессии желательного белка и т.д. Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии в клетке-хозяине млекопитающих включают вирусные элементы, управляющие высокими уровнями экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, происходящие из LTR ретровируса, цитомегаловируса (CMV) (например, промотор/энхансер CMV), вируса обезьян 40 (SV40) (например, промотор/энхансер SV40), аденовируса, (например, главный поздний промотор аденовируса (AdMLP)), вируса полиомы, и сильные промоторы млекопитающих, такие как нативные промоторы иммуноглобулинов и актина. Дополнительное описание вирусных регуляторных элементов и их последовательности; см., например, в патентах США 5168062, 4510245 и 4968615. Способы экспрессии антител в растениях, включая описание промоторов и векторов, также как трансформации растений, известны в данной области. См., например, патент США 6517529. Способы экспрессии полипептидов в клетках бактерий или клетках грибов, например клетках дрожжей, также хорошо известны в данной области.

В дополнение к генам цепей антитела и регуляторным последовательностям, рекombинантные экспрессирующие векторы по описанию могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, регулирующие репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и гены селективных маркеров. Ген селективного маркера облегчает отбор клеток-хозяев, в которые введен вектор (см., например, патенты США 4399216, 4634665 и 5179017). Например, как правило, ген селективного маркера придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую введен вектор. Например, гены селективных маркеров включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для использования в dhfr-клетках-хозяевах с отбором/амплификацией на метотрексате), ген пео (для отбора с G418) и ген глутамат-синтетазы.

Термин "последовательность для контроля экспрессии" в рамках изобретения обозначает полинуклеотидные последовательности, необходимые для эффекта экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. Последовательности для контроля экспрессии включают подходящие последовательности для инициации, терминации транскрипции, промоторные и энхансерные последовательности; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, стабилизирующие цитоплазматическую мРНК; последовательности, улучшающие эффективность трансляции (т.е. консенсусную последовательность Козак); последовательности, улучшающие стабильность белка; и когда желательно, последовательности, улучшающие секрецию белка. Природа таких контрольных последовательностей отличается в зависимости от организма-хозяина; у прокариот, такие контрольные последовательности, как правило, включают промотор, участок связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции; у эукариот, как правило, такие контрольные последовательности включают промоторы и последовательность терминации транскрипции. Термин "контрольные последовательности" предназначен для включения, как минимум, всех компонентов, присутствие которых является необходимым для экспрессии и процессинга, и может также включать дополнительные компоненты, присутствие которых обеспечивает преимущества,

например, лидерные последовательности и последовательности партнеров по связыванию.

Клетки-хозяева и способы получения антитела и композиции антитела.

Дополнительный аспект изобретения относится к способам получения композиций антител, и антиген-антител и их антигенсвязывающих частей по изобретению. Один вариант осуществления этого аспекта изобретения относится к способу получения антитела, как определено в настоящем описании, включающему получение рекомбинантной клетки-хозяина, способной экспрессировать антитело, культивирование указанной клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и выделение полученного антитела. Антитела, полученные посредством такой экспрессии в таких рекомбинантных клетках-хозяевах, обозначены в настоящем описании как "рекомбинантные антитела". Изобретение относится также к клеткам-потомкам таких клеток-хозяев и к продуцированным ими антителам.

Термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") в рамках изобретения обозначает клетку, в которую введен рекомбинантный экспрессирующий вектор.

Изобретение относится к клеткам-хозяевам, которые могут содержать, например, вектор по изобретению, описанный выше. Изобретение относится также к клеткам-хозяевам, содержащим, например, нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или обе, из антитела против PD-1 или его антигенсвязывающей части по изобретению. Следует понимать, что "рекомбинантная клетка-хозяин" и "клетка-хозяин" обозначает не только конкретную рассматриваемую клетку, но также потомство такой клетки. Поскольку определенные модификации могут возникать в последующих поколениях либо из-за мутации, либо из-за влияния внешней среды, такое потомство может фактически не являться идентичным родительской клетке, но все еще включено в объем термина "клетка-хозяин" в рамках изобретения.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела против PD-1, и векторы, содержащие эти молекулы нуклеиновой кислоты, можно использовать для трансфекции подходящей клетки-хозяина млекопитающего, растения, бактерии или дрожжей. Трансформацию можно проводить любым известным способом введения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают опосредованную декстраном трансфекцию, преципитацию фосфатом кальция, опосредованную полибренном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(полинуклеотидов) в липосомы и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновой кислоты можно вводить в клетки млекопитающих посредством вирусных векторов. Способы трансформации клеток хорошо известны в данной области. См., например, патенты США 4399216, 4912040, 4740461 и 4959455. Способы трансформации клеток растений хорошо известны в данной области, включая, например, опосредованную агробактериями трансформацию, биолиственную трансформацию, прямую инъекцию, электропорацию и вирусную трансформацию. Способы трансформации клеток бактерий и дрожжей также хорошо известны в данной области.

Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области и включают множество иммортализованных линий клеток, доступных из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Они включают среди прочего клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки NS0, клетки SP2, клетки HEK-293T, клетки 293 Freestyle (Invitrogen), клетки NIH-3T3, клетки HeLa, клетки почки детеныша хомяка (BHK), клетки почки африканской зеленой мартышки (COS), клетки печеночноклеточной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549 и ряд других линий клеток. Особенно предпочтительные линии клеток выбирают посредством определения того, какие линии клеток обладают высокими уровнями экспрессии. Другими линиями клеток, которые можно использовать, являются линии клеток насекомых, такие как клетки Sf9 или Sf21. Когда рекомбинантные экспрессирующие векторы, кодирующие гены антител, вводят в клетки-хозяева млекопитающих, антитела получают посредством культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного, чтобы позволить экспрессию антитела в клетках-хозяевах или, более предпочтительно, секрецию антитела в среду для культивирования, в которой выращивают клетки-хозяева. Антитела можно выделять из среды для культивирования с использованием стандартных способов очистки белка. Клетки-хозяева растений включают, например, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, ряску, кукурузу, пшеницу, картофель и т.д. Клетки-хозяева бактерий включают виды *E.coli* и *Streptomyces*. Клетки-хозяева дрожжей включают *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

Кроме того, экспрессию антител по изобретению или их антигенсвязывающих частей из линий клеток-продуцентов можно улучшать с использованием ряда известных способов. Например, экспрессия генов системы глутаминсинтетазы (системы GS) является общераспространенным способом улучшения экспрессии в определенных условиях. Систему GS обсуждают полностью или частично в связи с патентами EP 0216846, 0256055, 0323997 и 0338841.

Является вероятным, что антитела, экспрессированные в различных линиях клеток или в трансгенных животных, могут иметь отличные друг от друга паттерны гликозилирования. Однако все антитела, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, представленными в настоящем описании, или содержащие аминокислотные последовательности, представленные в настоящем описании, составляют часть

настоящего изобретения, независимо от состояния гликозилирования антител, и в более общем случае, независимо от присутствия или отсутствия посттрансляционной модификации(модификация).

Фармацевтические композиции.

Другой аспект изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей в качестве активного ингредиента (или в качестве единственного активного ингредиента) антитело против PD-1 или его антигенсвязывающую часть, или к композиции антитела против PD-1 по изобретению. Фармацевтическая композиция может содержать любую композицию антитела против PD-1, или антитело или его антигенсвязывающую часть, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиции предназначены для облегчения, предотвращения и/или лечения связанного с PD-1 нарушения и/или злокачественной опухоли. В рамках изобретения связанное с PD-1 или опосредованное PD-1 нарушение относится к нарушению, заболеванию или состоянию, которые улучшают, или замедляют их прогрессирование, посредством модуляции активности PD-1. В некоторых вариантах осуществления композиции предназначены для активации иммунной системы. В конкретных вариантах осуществления композиции предназначены для облегчения, предотвращения и/или лечения злокачественной опухоли, происходящей из таких тканей, как кожа, легкие, кишечник, ободочная кишка, яичник, головной мозг, предстательная железа, почка, мягкие ткани, гематопозитическая система, голова и шея, печень, мочевого пузыря, молочная железа, желудок, матка и поджелудочная железа.

Как правило, антитела, их антигенсвязывающие части и биспецифические связывающие молекулы по изобретению являются пригодными для введения в качестве состава в смеси с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителем(наполнителями), например, как описано ниже.

Фармацевтические композиции по изобретению могут содержать одно или несколько антител против PD-1 или связывающих частей или биспецифических связывающих молекул по изобретению, например одно или два антитела против PD-1, связывающих частей или биспецифических связывающих молекул. В одном варианте осуществления композиция содержит одно антитело против PD-1 по изобретению или его связывающую часть.

В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция может содержать по меньшей мере одно антитело против PD-1 или его антигенсвязывающую часть, например одно антитело против PD-1 или часть, и одно или несколько дополнительных антител, нацеленных на один или несколько соответствующих рецепторов поверхности клетки, например один или несколько имеющих отношение к злокачественным опухолям рецепторов.

Термин "наполнитель" используют в настоящем описании для описания любого ингредиента, отличного от соединения(соединений) по изобретению. Выбор наполнителя(наполнителей) в большой степени зависит от таких факторов, как конкретный способ введения, эффект наполнителя на растворимость и стабильность, и характер лекарственной формы. В рамках изобретения "фармацевтически приемлемый наполнитель" включает все без исключения растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства, и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Некоторыми примерами фармацевтически приемлемых наполнителей являются вода, солевой раствор, фосфатно-солевой буфер, декстроза, глицерин, этанол и т.п., так же как их комбинации. Во многих случаях, является предпочтительным включение в композицию изотонических средств, например сахаров, полиспиртов, таких как маннит или сорбит, и хлорида натрия. Дополнительными примерами фармацевтически приемлемых веществ являются увлажняющие средства или незначительные количества вспомогательных веществ, таких как увлажняющие средства или эмульгаторы, консерванты или буферы, которые улучшают срок хранения или эффективность антитела.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению и способы их получения очевидны специалистам в данной области. Такие композиции и способы их получения можно обнаружить, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th edition (Mack Publishing Company, 1995). Фармацевтические композиции предпочтительно изготавливают в условиях GMP (надлежащей производственной практики).

Фармацевтическую композицию по изобретению можно получать, упаковывать или продавать без расфасовки, в форме единичной однократной дозы или в форме множества единичных однократных доз. В рамках изобретения "единичная доза" представляет собой дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей predetermined количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента, как правило, равно дозе активного ингредиента, которую можно вводить субъекту, или удобной части такой дозы, например, такой как одна вторая или одна третья такой дозы.

Любой способ введения пептидов, белков или антител, принятый в данной области, можно подходящим образом использовать для антител и антигенсвязывающих частей по изобретению.

Фармацевтические композиции по изобретению, как правило, являются пригодными для парентерального введения. В рамках изобретения "парентеральное введение" фармацевтической композиции включает любой способ введения, характеризующийся физическим повреждением ткани субъекта и введением фармацевтической композиции через отверстие в ткани, таким образом, как правило, приводящий к непосредственному введению в кровоток, в мышцу или во внутренний орган. Парентеральное введение, таким образом, включает, но без ограничения введение фармацевтической композиции посред-

вом инъекции композиции, посредством введения композиции через хирургический разрез, посредством введения композиции через проникающую в ткани нехирургическую рану и т.п. В частности, предусматривают, что парентеральное введение включает, но без ограничения подкожные, внутрибрюшинные, внутримышечные, интратеральные, внутривенные, внутриартериальные, интратекальные, интравентрикулярные, интрауретральные, интракраниальные, внутриопухолевые и интрасиновиальные инъекции или инфузии; и способы диалитической инфузии почки. Предусмотрена также региональная перфузия. Конкретные варианты осуществления включают способы внутривенного и подкожного введения.

Составы фармацевтической композиции, пригодные для парентерального введения, как правило, содержат активный ингредиент в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, таким как стерильная вода или стерильный изотонический солевой раствор. Такие составы можно получать, упаковывать или продавать в форме, подходящей для болюсного введения или для непрерывного введения. Пригодные для инъекций составы можно получать, упаковывать или продавать в форме единичной дозы, например, в ампулах, или в контейнерах для множества доз, содержащих консервант. Составы для парентерального введения включают, но без ограничения суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных носителях, пасты и т.п. Такие составы могут, кроме того, содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, включая, но без ограничения суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие средства. В одном варианте осуществления состава для парентерального введения, активный ингредиент представлен в сухой (т.е. порошкообразной или гранулярной) форме для разведения с использованием подходящего носителя (например, стерильной апиrogenной воды) перед парентеральным введением разведенной композиции. Парентеральные составы включают также водные растворы, которые могут содержать наполнители, такие как соли, углеводы и забуферивающие средства (предпочтительно, с рН от 3 до 9), однако для некоторых применений их можно более подходящим образом составлять в форме стерильного неводного раствора или в сухой форме, предназначенной для использования вместе с подходящим носителем, таким как стерильная, апиrogenная вода. Иллюстративные формы для парентерального введения включают растворы или суспензии в стерильных водных растворах, например, водных растворах пропиленгликоля или декстрозы. Такие лекарственные формы можно подходящим образом забуферивать, если желательно. Другие пригодные для парентерального введения составы, которые можно использовать, включают составы, содержащие активный ингредиент в микрокристаллической форме или в липосомном препарате. Составы для парентерального введения можно получать для немедленного и/или модифицированного высвобождения. Составы для модифицированного высвобождения включают отложенное, замедленное, пульсирующее, контролируемое, направленное и программируемое высвобождение.

Например, в одном аспекте стерильные пригодные для инъекции растворы можно получать посредством включения антитела против PD-1 или его антигенсвязывающей части, биспецифической связывающей молекулы или композиции антитела против PD-1 в необходимом количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше по необходимости с последующей стерилизацией фильтрацией. Как правило, дисперсии получают посредством включения активного соединения в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных пригодных для инъекции растворов, предпочтительными способами получения являются сушка в вакууме и лиофилизация с получением порошка активного ингредиента плюс любого желательного дополнительного ингредиента из их предварительно простерилизованного фильтрацией раствора. Надлежащую текучесть раствора можно поддерживать, например, посредством использования покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и посредством использования поверхностно-активных веществ. Длительную абсорбцию пригодных для инъекции композиций можно достигать посредством включения в композицию средства, замедляющего абсорбцию, например, солей моностеаратов и желатина, и/или посредством использования покрытий с модифицированным высвобождением (например, покрытий с замедленным высвобождением).

Антитела по изобретению можно также вводить интраназально или посредством ингаляции, как правило, в форме сухого порошка (либо отдельно, в форме смеси, либо в форме смешанных частиц компонентов, например, смешанных с подходящим фармацевтически приемлемым наполнителем) из ингаляторов для сухого порошка, в форме аэрозоля, распыляемого из контейнера под давлением, посредством помпы, спрея, распылителя (предпочтительно, распылителя с использованием электрогидродинамики для получения тумана из мелких частиц) или небулайзера, с использованием или без использования подходящего пропеллента, или в форме капель для носа.

Контейнер под давлением, помпа, спрей, распылитель или небулайзер, как правило, содержит раствор или суспензию антитела по изобретению, содержащие, например, подходящее средство для диспергирования, сольubilизации или усиления высвобождения активного вещества, пропеллент(ы) в качестве растворителя.

Перед использованием в сухом порошкообразном или суспензионном составе, продукт лекарственного средства, как правило, измельчают до размера, подходящего для доставки с помощью ингаляции (обычно менее 5 микрон). Это можно осуществлять любым подходящим способом, измельчения, таким

как размол на спиральной струйной мельнице, размол на струйной мельнице с кипящим слоем, обработка сверхкритической жидкости для получения наночастиц, гомогенизация при высоком давлении или сушка распылением.

Можно получать капсулы, блистеры и картриджи для использования в ингаляторах или инсуффляторах, содержащие порошкообразную смесь соединения по изобретению, подходящую порошкообразную основу и модификатор активности.

Подходящий состав раствора для применения в распылителе с использованием электрогидродинамики для получения тумана из мелких частиц может содержать подходящую дозу антитела по изобретению на запуск и объем запуска может, например, меняться от 1 до 100 мкл.

Составы для ингаляционного/интраназального введения можно получать для немедленного и/или модифицированного высвобождения. Составы для модифицированного высвобождения включают отложенное, замедленное, пульсирующее, контролируемое, направленное и программируемое высвобождение.

В случае ингаляторов для сухого порошка и аэрозолей, единичную дозу представляет собой определяющую посредством клапана, доставляющего отмеренное количество. Единицы в соответствии с изобретением, как правило, составляют для введения отмеренной дозы или "выпуска" антитела по изобретению. Общую ежесуточную дозу, как правило, вводят в однократной дозе или более обычно в дробных дозах на протяжении суток.

Антитела и части антител по изобретению можно также составлять для введения пероральным способом. Пероральное введение может включать проглатывание, так что соединение входит в желудочно-кишечный тракт и/или трансбуккальное, лингвальное или подъязычное введение, посредством которого соединение входит в кровоток непосредственно из ротовой полости.

Составы, пригодные для перорального введения, включают твердые, полутвердые и жидкие системы, такие как таблетки; мягкие или твердые капсулы, содержащие мульти- или наночастицы, жидкости или порошки; пастилки (включая наполненные жидкостью); жевательные таблетки; гели; быстро диспергируемые лекарственные формы; пленки; суппозитории; спреи; и трансбуккальные/мукоадгезивные пластыри.

Жидкие составы включают суспензии, растворы, сиропы и эликсиры. Такие составы можно использовать в качестве наполнителей для мягких или твердых капсул (изготовленных, например, из желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), и, как правило, они содержат носитель, например, воду, этанол, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, метилцеллюлозу или подходящее масло и одно или несколько из эмульгаторов и/или суспендирующих средств. Жидкие составы можно также получать посредством разведения твердого вещества, например из саше.

Терапевтические применения антител и композиций по изобретению.

В одном аспекте антитела против PD-1 и их антигенсвязывающие части, композиции антител против PD-1 и биспецифические связывающие молекулы по изобретению используют для усиления или активации иммунной системы у нуждающегося в этом человека. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет подавленный иммунитет. Например, терапевт может осуществлять бустер-стимуляцию противораковой активности собственной иммунной системы пациента посредством введения антитела против PD-1, антигенсвязывающей части, композиции или биспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению, отдельно или в комбинации с другими лекарственными средствами (последовательно или параллельно). Антитело против PD-1 или часть, композиция или биспецифическая связывающая молекула модулирует активность PD-1 в иммунocyтах, приводя к усилению противоракового иммунитета. В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, композиция или биспецифическая связывающая молекула предназначены для использования в лечении злокачественной опухоли, например, злокачественных опухолей, происходящих из таких тканей, таких как кожа, легкие, кишечник, ободочная кишка, яичник, головной мозг, предстательная железа, почка, мягкие ткани, гематопозитическая система, голова и шея, печень, мочевого пузырь, молочная железа, желудок, матка и поджелудочная железа, и любых злокачественных опухолей или других состояний, которые основаны на активности PD-1, и/или при которых у пациента происходит экспрессия или сверхэкспрессия PD1, PD-L1 и/или PD-L2. Злокачественные опухоли, подвергаемые лечению посредством антител против PD-1, их антигенсвязывающих частей, композиций антител против PD-1 и/или биспецифических связывающих молекул по изобретению, могут включать, например, меланому (такую как меланома на поздних стадиях, или неоперабельная или метастазирующая меланома), немелкоклеточный рак легкого, рак мочевого пузыря, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак яичника, колоректальный рак, рак желудка, злокачественную опухоль с высокой нестабильностью микросателлитов, печеночноклеточную карциному, мезотелиому, карциному из клеток Меркеля, глиому, множественную миелому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина и почечноклеточный рак (RCC).

В некоторых вариантах осуществления злокачественные опухоли, подвергаемые лечению посредством антител против PD-1, антигенсвязывающих частей, композиций антител против PD-1 и/или биспецифических связывающих молекул по изобретению, могут включать, например, находящуюся на поздних стадиях или метастазирующую меланому, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный рак головы и шеи, почечноклеточный рак, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, глиобластому,

глиому, нейроэндокринные опухоли, плоскоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, печеночноклеточную карциному, рак мочевого пузыря, рак верхних мочевых путей, рак пищевода, злокачественную опухоль желудочно-пищеводного соединения, рак желудка, рак печени, рак ободочной кишки, колоректальную карциному, множественную миелому, саркомы, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, миелодиспластический синдром, рак носоглотки, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, мелколимфоцитарную лимфому, рак яичника, злокачественную опухоль желудочно-кишечного тракта, первичный перитонеальный рак, злокачественную опухоль фаллопиевых труб, уротелиальную злокачественную опухоль, ассоциированные с HTLV Т-клеточные лейкоз/лимфому, рак предстательной железы, злокачественную опухоль мочеполового тракта, менингиому, злокачественную опухоль коры надпочечников, глиосаркому, рак почки, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак эндометрия, базальноклеточный рак кожи, злокачественную опухоль аппендикса, злокачественную опухоль желчных протоков, злокачественную опухоль слюнных желез, злокачественную опухоль из клеток Меркеля на поздних стадиях, злокачественную опухоль мочеполовой системы, рак кости, злокачественную опухоль грудной клетки, злокачественную опухоль дыхательных путей, аденокистозную карциному, рак шейки матки, астроцитому, хордому, гематологические неоплазии, нейробластому, злокачественную опухоль ротовой полости, плоскоклеточную карциному кожи, рак щитовидной железы, саркому Капоши, злокачественную опухоль анального канала, рак желчного пузыря, злокачественную опухоль тимуса, рак тела матки, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, мезотелиому или солидные опухоли. Злокачественная опухоль может, например, находиться на ранней, промежуточной, поздней или метастазирующей стадии.

В некоторых вариантах осуществления антитела против PD-1, антигенсвязывающие части, композиции и/или биспецифические связывающие молекулы по изобретению можно использовать для лечения вирусных и/или паразитических инфекций, например, где патогены ингибируют иммунный ответ хозяина. В качестве примера, патоген может представлять собой, например, HIV, гепатит (А, В, или С), вирус папилломы человека (HPV), вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), аденовирус, флавивир, эховирус, риновирус, вирус Коксаки, комовирус, респираторно-синцитиальный вирус, вирус свинки, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус осповакцины, Т-клеточный лимфотрофический вирус человека (HTLV), вирус Денге, вирус контагиозного моллюска, вирус полиомиелита, вирус бешенства, вирус Джона Каннингема (JC), вирус арбовирусного энцефалита, вирус иммунодефицита обезьян (SIV), вирус гриппа, герпеса, гиардию, возбудитель малярии, *Leishmania*, *Staphylococcus aureus* или *Pseudomonas aeruginosa*.

В некоторых вариантах осуществления антитела против PD-1, антигенсвязывающие части, композиции и/или биспецифические связывающие молекулы по изобретению можно использовать для лечения пациента, который имеет иммунную недостаточность или подвержен риску развития иммунной недостаточности (например, из-за химиотерапевтического средства или радиотерапии).

"Лечить", "лечение" и "обработка" относятся к способу облегчения или прекращения биологического нарушения и/или по меньшей мере одного из сопутствующих ему симптомов. В рамках изобретения "облегчение" заболевания, нарушения или состояния обозначает уменьшение тяжести и/или частоты возникновения симптомов заболевания, нарушения или состояния.

Кроме того, ссылки в настоящем описании на "лечение" включают ссылки на излечивающее, паллиативное и профилактическое лечение.

"Терапевтически эффективное количество" относится к количеству вводимого лекарственного средства, которое может облегчать до некоторой степени один или несколько симптомов нарушения, подвергаемого лечению. Терапевтически эффективное количество противоракового лекарственного средства может, например, приводить к уменьшению размеров опухоли, увеличению выживаемости, уничтожению клеток злокачественных опухолей, уменьшению прогрессирования заболевания, прекращению метастазирования или другим клиническим конечным точкам, желательным с точки зрения работников здравоохранения.

Антитела против PD-1 или их антигенсвязывающие части, композиции или биспецифические связывающие молекулы по изобретению можно вводить отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими лекарственными средствами или антителами (или в форме любой их комбинации). Фармацевтические композиции, способы и применения по изобретению, таким образом, также включают варианты осуществления комбинаций (совместного введения) с другими действующими веществами, как подробно описано ниже.

В рамках изобретения термины "совместное введение", "введенные совместно" и "в комбинации с" применительно к антителам и их антигенсвязывающим частям, композициям и биспецифическим связывающим молекулам по изобретению, с одним или несколькими другими лекарственными средствами, обозначают следующее и относятся к следующему, и включают следующее:

одновременное введение такой комбинации антитела/антигенсвязывающей части/композиции антитела/биспецифической связывающей молекулы по изобретению и лекарственного средства(средств) нуждающемуся в лечении пациенту, когда такие компоненты составлены вместе в одну лекарственную форму, которая высвобождает указанные компоненты по существу в одно и то же время у указанного

пациента;

по существу одновременное введение такой комбинации антитела/антигенсвязывающей части/композиции антитела/биспецифической связывающей молекулы по изобретению и лекарственного средства(средств) нуждающемуся в лечении пациенту, когда такие компоненты составлены отдельно друг от друга в отдельные лекарственные формы, которые вводят по существу в одно и то же время указанному пациенту, вследствие чего указанные компоненты высвобождаются по существу в одно и то же время у указанного пациента;

последовательное введение такой комбинации антитела/антигенсвязывающей части/композиции антитела/биспецифической связывающей молекулы по изобретению и лекарственного средства(средств) нуждающемуся в лечении пациенту, когда такие компоненты составлены отдельно друг от друга в отдельные лекарственные формы, которые вводят в последовательные периоды времени указанному пациенту, с значительными интервалами времени между каждым введением, вследствие чего указанные компоненты высвобождаются по существу в различные периоды времени у указанного пациента; и

последовательное введение такой комбинации антитела/антигенсвязывающей части/композиции антитела/биспецифической связывающей молекулы по изобретению и лекарственного средства(средств) нуждающемуся в лечении пациенту, когда такие компоненты составлены вместе в одну лекарственную форму, которая высвобождает указанные компоненты контролируемым образом, вследствие чего они высвобождаются одновременно, последовательно и/или с перекрыванием, в одно и то же время и/или в различные периоды времени у указанного пациента, где каждую часть можно вводить либо одинаковым, либо различным способом.

Антитела и их антигенсвязывающие части, композиции антител и биспецифические связывающие молекулы по изобретению можно вводить без дополнительных видов терапевтического лечения, т.е. в качестве самостоятельной терапии (монотерапии). Альтернативно лечение с использованием антител и их антигенсвязывающих частей, композиций и биспецифических связывающих молекул по изобретению может включать по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое лечение (комбинированная терапия), например, другое иммуностимулирующее средство, противораковое средство, противовирусное средство или вакцину (например, противоопухолевую вакцину). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающую часть, композицию или биспецифическую связывающую молекулу можно вводить совместно или составлять вместе с другим медицинским/лекарственным средством для лечения злокачественной опухоли. Дополнительное терапевтическое лечение может включать, например, химиотерапевтическое средство, антинеопластическое или антиангиогенное средство, другое противораковое антитело и/или радиотерапию.

Посредством комбинации антител, антигенсвязывающих частей, композиций или биспецифических связывающих молекул по изобретению со средствами, как известно, индуцирующими терминальную дифференцировку клеток злокачественных опухолей, эффект можно далее улучшать. Такие соединения можно, например, выбирать из группы, состоящей из ретиноевой кислоты, транс-ретиноевых кислот, цис-ретиноевых кислот, фенилбутирата, фактора роста нервов, диметилсульфоксида, активной формы витамина D₃, активируемого пролифератором пероксисом гамма-рецептора, 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетата, гексаметилен-бис-ацетамида, трансформирующего фактора роста-бета, масляной кислоты, циклического AMP и веснаринона. В некоторых вариантах осуществления соединение выбрано из группы, состоящей из ретиноевой кислоты, фенилбутирата, полностью-транс-ретиноевой кислоты и активной формы витамина D.

Фармацевтические препараты, содержащие антитело против PD-1 или его антигенсвязывающую часть, композицию или биспецифическую связывающую молекулу по изобретению и по меньшей мере одно другое средство (например, химиотерапевтическое средство, антинеопластическое или антиангиогенное средство), можно использовать в качестве комбинированного лечения для одновременного, отдельного или последовательного введения при терапии злокачественных опухолей. Другое средство может представлять собой любое средство, подходящее для лечения конкретной рассматриваемой злокачественной опухоли, например средство, выбранное из группы, состоящей из алкилирующих средств, например, производные платины, такие как цисплатин, карбоплатин и/или оксалиплатин; растительные алкалоиды, например, паклитаксел, доцетаксел и/или иринотекан; противоопухолевые антибиотики, например, доксорубицин (адриамицин), даунорубицин, эпирубицин, идарубицин, митоксантрон, дактиномицин, блеомицин, актиномицин, лютеомицин и/или митомицин; ингибиторы топоизомеразы, такие как топотекан; и/или антиметаболиты, например, фторурацил и/или другие фторпиримидины.

Антитело против PD-1 или его антигенсвязывающую часть, композицию антитела или биспецифическую связывающую молекулу по изобретению можно использовать также в комбинации с другими противораковыми терапевтическими средствами, такими как вакцины, цитокины, ингибиторы ферментов, иммуностимулирующие соединения и виды Т-клеточной терапии. В случае вакцины, она может представлять собой, например, вакцину на основе белка, пептида или ДНК, содержащую один или несколько антигенов, важных для злокачественной опухоли, подвергаемой лечению, или вакцину, содержащую дендритные клетки вместе с антигеном. Подходящие цитокины включают, например, IL-2, IFN-гамма и GM-CSF. Примером типа ингибитора фермента, имеющего противораковую активность,

является ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), например, 1-метил-D-триптофан (1-D-MT). Адоптивная Т-клеточная терапия относится к различным способам иммунотерапии, включающим размножение или модификацию собственных Т-клеток пациентов для распознавания и атаки их опухолей.

Предусматривают также, что антитело против PD-1 или его антигенсвязывающую часть, композицию антитела или биспецифическую связывающую молекулу по изобретению можно использовать в вспомогательной терапии в сочетании с ингибиторами тирозинкиназы. Они представляют собой синтетические, в основном, происходящие из хиназолина, молекулы с низкой молекулярной массой, которые взаимодействуют с внутриклеточным доменом тирозинкиназы рецепторов и ингибируют индуцированное лигандом фосфорилирование рецептора посредством конкуренции за внутриклеточный участок связывания Mg-АТР.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающую часть, композицию или биспецифическую связывающую молекулу можно использовать в комбинации с другим медицинским/лекарственным средством, опосредующим активацию иммунной системы, включая, но без ограничения средства, модулирующее экспрессию или активность A2AR, BTLA, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, CD27, CD28, CD40, CD55, CD73, CD122, CD137, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, CTLA-3, CEACAM (например, CEACAM-1 и/или CEACAM-5), GAL9, GATR, HVEM, ICOS, IDO, KIR, LAIR1, LAG-3, OX40, TIGIT, TIM-3, TGFR-бета, VISTA, LILRB2, CMTM6 и/или 2B4. В конкретных вариантах осуществления средство представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с одной из вышеуказанных молекул. В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающую часть, композицию или биспецифическую связывающую молекулу по изобретению можно вводить в комбинации с ингибитором CTLA-4 (например, антителом против CTLA-4, таким как тремелимуаб или ипилимумаб). В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающую часть, композицию или биспецифическую связывающую молекулу по изобретению можно вводить в комбинации с ипилимумабом.

В конкретных аспектах антитела и антигенсвязывающие части, композиции и биспецифические связывающие молекулы по изобретению можно вводить в комбинации с другим ингибитором пути PD-1, который может быть нацелен на PD-1 или один или несколько из его лигандов. Примеры таких ингибиторов включают другие антитела против PD-1, антитела против PD-L1 и антитела против PD-L2. В некоторых вариантах осуществления антитело против PD1 или его антигенсвязывающую часть, биспецифическое антитело или композицию антитела по изобретению можно вводить в комбинации с пембролизумабом и/или ниволумабом.

Понятно, что антитела и их антигенсвязывающие части, композиции антител и биспецифические связывающие молекулы по изобретению могут быть использованы в способе лечения, как описано в настоящем описании, могут быть предназначены для использования в лечении, как описано в настоящем описании и/или могут быть предназначены для использования в изготовлении лекарственного средства для лечения, как описано в настоящем описании. Изобретение относится также к наборам и изделиям, содержащим антитела и их антигенсвязывающие части, композиции антител и/или биспецифические связывающие молекулы, описанные в настоящем описании.

Дозы и способ введения.

Антитела или их антигенсвязывающие части, композиции и биспецифические связывающие молекулы по изобретению вводят в эффективном количестве для лечения рассматриваемого состояния, т.е. в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желательного результата. Терапевтически эффективное количество может меняться в соответствии с такими факторами, как конкретное состояние, подвергаемое лечению, возраст, пол и масса пациент, и с тем, вводят ли антитела в качестве самостоятельного лечения или в комбинации с одним или несколькими дополнительными противораковыми лекарственными средствами.

Режимы дозирования можно корректировать для обеспечения оптимального желательного ответа. Например, можно вводить однократный болюс, несколько дробных доз можно вводить с течением времени, или дозу можно пропорционально уменьшать или увеличивать, как показано по потребностям терапевтической ситуации. Особенные преимущества предоставляет составление парентеральных композиций в форме единичных доз для простоты введения и единообразия дозирования. Единичная дозированная форма, в рамках изобретения относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве однократных доз для пациентов/субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит predetermined количество активного соединения, рассчитанного для оказания желательного терапевтического эффекта в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификации единичных дозированных форм по изобретению, как правило, обусловлены и напрямую зависят от

(а) уникальных характеристик химиотерапевтического средства и конкретного терапевтического или профилактического эффекта, подлежащего достижению; и

(б) ограничений, присущих в области получения составов, например, активному соединению для лечения, по чувствительности у индивидуумов.

Таким образом, специалисту в данной области понятно, на основании описания, представленного в настоящей заявке, что дозу и режим дозирования корректируют в соответствии со способами, хорошо

известными в области терапии. Т.е. максимальную переносимую дозу можно легко определять, и эффективное количество, обеспечивающее поддающееся детекции терапевтическое преимущество для пациента, также можно определять, как можно определять требования ко времени введения каждого средства для обеспечения поддающегося детекции терапевтического преимущества для пациента. Соответственно в то время как конкретные дозы и режимы введения проиллюстрированы в настоящем описании, эти примеры никаким образом не ограничивают дозу и режим введения, которые можно обеспечивать для пациента при практическом осуществлении настоящего изобретения.

Следует отметить, что уровень дозирования можно менять в зависимости от типа и тяжести состояния, подлежащего облегчению, и дозирование может включать однократные или множественные дозы. Кроме того, понятно, что для любого конкретного субъекта, конкретный режим дозирования следует корректировать с течением времени, в соответствии с потребностями индивидуума и профессиональным решением лица, осуществляющего введение или руководящего введением композиции, и что диапазоны концентраций, представленные в настоящем описании, являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения объема или практического применения заявленной композиции. Кроме того, режим дозирования композиций по этому изобретению может быть основан на множестве факторов, включая тип заболевания, возраст, массу, пол, медицинское состояние пациента, тяжесть состояния, способ введения и конкретное используемое анти тело. Таким образом, режим дозирования может широко меняться, но его можно определять общепринятым образом с использованием стандартных способов. Например, дозы можно корректировать на основе фармакокинетических или фармакодинамических параметров, которые могут включать клинические эффекты, такие как токсические эффекты, и/или лабораторные значения. Таким образом, настоящее изобретение включает повышение дозы для одного и того же пациента, как определено специалистом в данной области. Определение соответствующих доз и режимов хорошо известно в соответствующей области и будет понятно специалисту в данной области при предоставлении объяснений, описанных в настоящем описании.

Предусматривают, что подходящая доза анти тела или его антигенсвязывающей части, композиции или биспецифической связывающей молекулы по изобретению может лежать в диапазоне 0,1-100 мг/кг, например приблизительно 0,5-50 мг/кг, например приблизительно 1-20 мг/кг. Анти тело, антигенсвязывающую часть, композицию или биспецифическую связывающую молекулу можно, например, вводить в дозе по меньшей мере 0,25 мг/кг, например по меньшей мере 0,5 мг/кг, например по меньшей мере 1 мг/кг, например по меньшей мере 1,5 мг/кг, например по меньшей мере 2 мг/кг, например по меньшей мере 3 мг/кг, например по меньшей мере 4 мг/кг, например по меньшей мере 5 мг/кг; и например, вплоть до максимум 50 мг/кг, например вплоть до максимум 30 мг/кг, например вплоть до максимум 20 мг/кг, например вплоть до максимум 15 мг/кг. Введение обычно можно повторять с подходящими интервалами, например, один раз в неделю, один раз в каждые две недели, один раз в каждые три недели или один раз в каждые четыре недели и в течение настолько длительного периода времени, как считает подходящим ответственный медицинский работник, который может необязательно увеличивать или уменьшать дозу по необходимости.

Эффективное количество для терапии опухолей можно измерять по его способности стабилизировать прогрессирование заболевания и/или облегчать симптомы у пациента и предпочтительно обращать прогрессирование заболевания, например, посредством уменьшения объема опухоли. Способность анти тела, антигенсвязывающей части, композиции или биспецифической связывающей молекулы по изобретению ингибировать злокачественную опухоль можно оценивать в анализах *in vitro*, например, как описано в примерах, так же как в подходящих моделях на животных, которые являются прогностическими для эффективности для опухолей человека. Подходящие режимы дозирования можно выбирать для обеспечения оптимального терапевтического ответа в каждой конкретной ситуации, например, введения в форме однократного болюса или в форме непрерывной инфузии, и с возможной коррекцией дозы, как продиктовано потребностями каждого случая.

Диагностические применения и композиции.

Анти тела по настоящему изобретению можно также использовать в диагностических способах (например, *in vitro*, *ex vivo*). Например, анти тела можно использовать для детекции и/или измерения уровня PD-1 в образце от пациента (например, образце ткани или образце биологической жидкости, такой как воспалительный экссудат, кровь, сыворотка, жидкость из кишечника, слюна или моча). Подходящие способы детекции и измерения включают иммунологические способы, такие как проточная цитометрия, твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), анализы хемилюминесценции, радиоиммунные анализы и иммуногистология. Изобретение, кроме того, относится к наборам (например, диагностическим наборам), содержащим анти тела, описанные в настоящем описании.

Если в настоящем описании не определено иное, все научные и технические термины, используемые применительно к настоящему изобретению, имеют значения, которые являются общеизвестными специалисту в данной области. Иллюстративные способы и материалы описаны ниже, хотя способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в настоящем описании, также можно использовать в практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения. В случае несоответствия настоящего описания, включая определения, имеет преимущество.

В общем номенклатура и способы, используемые применительно к культуре клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, аналитической химии, синтетической органической химии, медицинской и фармацевтической химии и химии белков и нуклеиновых кислот и гибридизации, описанные в настоящем описании, являются хорошо известными и общепринятыми в данной области. Ферментные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии со спецификациями производителя, как обычно используют в данной области или как описано в настоящем описании.

Кроме того, если контекст не требует иного, термины единственного числа включают множественное число, и термины множественного числа включают единственное число. На протяжении этого описания и вариантов осуществления слова "иметь" и "содержать" или варианты, такие как "имеет", "имеющий", "содержит" или "содержащий", следует понимать как включающие указанное целое число или группу целых чисел, но не исключающие любое другое целое число или группу целых чисел.

Полное содержание всех публикаций и других ссылок, упомянутых в настоящем описании, приведено в качестве ссылки. Несмотря на то что ряд документов процитирован в настоящем описании, это цитирование не составляет допущение того, что любой из этих документов составляет часть общеизвестного уровня техники.

Чтобы это изобретение можно было лучше понять, приведены следующие примеры. Эти примеры приведены только с целью иллюстрации, и их не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения каким-либо образом.

Примеры

Пример 1. Получение и скрининг репертуаров антител против PD-1.

Материалы и способы.

Крыс OmniRat® (Osborn et al., *J Immunol.*, 2013, 190(4):1481-90), сконструированную линию крыс из OMT (Open Monoclonal Technology, Inc.), способную продуцировать человеческие антитела, иммунизировали антигенами PD-1 человека, яванского макака или мыши. Клонирование генов антител из отсортированных по отдельным клеткам секретирующих антитела В-клеток (ASC), полученных от крыс, проводили посредством технологии выявления антител Symplex™ (Meijer et al., *J. Mol. Biol.*, 2006, 358(3):764-12; US 7749697; WO 2008/104184).

Библиотеку антител Symplex™ получали из отсортированных по отдельным клеткам В-клеток от иммунизированных крыс OMT, эта библиотека содержала кодирующие родственные пары VH и VL для каждой отсортированной В-клетки. Конструкции для экспрессии репертуара антител кодировали полностью человеческие иммуноглобулины в формате IgG1, несущие две мутации (L234A/L235A), известные как уменьшающие эффекторную функцию области Fc антитела IgG1 (Hezareh et al., *J. Virol.*, 75 (24):12161-8 (2001)).

Клетки CHO-S трансфицировали в 384-луночном формате с использованием экспрессирующих конструкций для экспонирования PD-1 человека, яванского макака или мыши, с использованием реагента Freestyle™ MAX (Invitrogen). Кроме того, другую популяцию клеток трансфицировали контрольным вектором, кодирующим не относящийся к делу белок VEGFR2 человека, и впоследствии использовали в качестве отрицательного контроля. Чтобы обеспечить разработку условий мультиплексного скрининга, контрольные клетки, меченные с промежуточной интенсивностью сукцинимидиловым сложным эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE^{промеж}), трансфицированные PD-1 яванского макака клетки, меченные с высокой интенсивностью CFSE (CFSE^{высок}) и немеченные трансфицированные PD-1 человека клетки, смешивали в соотношении 1:1:1, с плотностью 1×10⁶ клеток на мл. В 384-луночных планшетах, 40 мкл этой смеси клеток смешивали с 10 мкл содержащего антитело супернатанта, и связанное с клетками антитело выявляли посредством добавления вторичного антитела козы против IgG человека (H+L) AF647 (Molecular Probes, Cat. № A21445). Параллельно проводили скрининг антител по связыванию с PD-1 человека (CFSE^{пол}) и мыши (CFSE^{отп}) при сходной постановке эксперимента. Образцы получали с использованием высокопроизводительной проточной цитометрии (iQue® Screener, Intellicyt), и данные анализировали с использованием программного обеспечения ForeCyt® посредством нанесения на график CFSE против связывания IgG (AF647). Первичные наилучшие кандидаты, специфические для PD-1, идентифицировали как клоны антител, связывающиеся с клетками, трансфицированными PD-1 как человека (CSFE^{отп}), так и яванского макака (CFSE^{высок}), но не с контрольными клетками (CSFE^{промеж}), и номера планшетов и координаты планшетов собирали для отбора наилучших кандидатов и последующего анализа последовательности. Несколько первичных наилучших кандидатов, проявляющих дополнительную реакционную способность по отношению к PD-1 мыши во втором скрининге (CFSE^{отп}), также отбирали для дальнейшего анализа.

Результаты.

На фиг. 1A-1D показаны репрезентативные точечные диаграммы проточной цитометрии для четырех клонов антител против PD-1, имеющих различную реакционную способность по отношению к ортологам PD-1:

- (a) клон антитела, связывающегося неспецифически с клетками CHO-S;
- (b) клон антитела, связывающегося специфически только с клетками, трансфицированными PD-1

человека;

(с) клона антитела, связывающегося специфически с PD-1 человека и яванского макака; и

(d) клона антитела, связывающегося со всеми тремя видами PD-1 при скрининге.

Верхние точечные диаграммы в каждом из (a), (b), (c) и (d) представляют первый цикл скрининга, тестирующий антитела по связыванию с PD-1 человека (huPD1) и PD-1 яванского макака (суноPD1) по сравнению с отрицательными контрольными клетками (отр). Нижние точечные диаграммы представляют второй цикл скрининга, тестирующий антитела по связыванию с PD-1 мыши (moPD1) и PD-1 человека (huPD1). По x-оси (горизонтальной) показан CFSE и по y-оси (вертикальной) показано связывание IgG человека.

Пример 2. Последовательности антител.

Наилучшие кандидаты при скрининге анализировали посредством секвенирования ДНК и выделяли кодирующие антитело последовательности ДНК. 488 первичных наилучших кандидатов, имеющих перекрестную реакционную способность по отношению к PD-1 человека и яванского макака, секвенировали. Таким образом выявили, что репертуар наилучших кандидатов против PD-1 содержал 254 уникальных антитела, представляющих 140 генетических кластеров. Отобранные клоны антител индивидуально экспрессировали и тестировали функционально, как описано ниже. Двенадцать антител, проявляющих функциональную активность в анализах *in vitro*, описаны далее в настоящем описании. Нумерация белковых последовательностей доменов VH и VL этих двенадцати антител показана в табл. 1. Нумерация последовательностей константных областей иммуноглобулина (тяжелая цепь Ig (IgHC) с мутациями L234A/L235A и легкая цепь каппа Ig (IgKV)), использованных для клонирования генов переменных VH и VL, показана в табл. 2. Нумерация последовательностей CDR двенадцати функциональных антител показана в табл. 3. Последовательности CDR в настоящем описании определены в соответствии с определениями IMGT® для CDR1 и CDR2. Для CDR3 тяжелой и легкой цепей определения в настоящем описании включают один дополнительный аминокислотный остаток к amino-концу от IMGT-CDR3 (Cys).

Таблица 1

Нумерация аминокислотных последовательностей переменных доменов антител

Номер антитела	Белок VH, SEQ ID NO.	Белок VL, SEQ ID NO.
18040	1	2
18049	3	4
18098	5	6
18113	7	8
18201	9	10
18247	11	12
18250	13	14
18325	15	16
18366	17	18
18400	19	20
18413	21	22
18483	23	24

Таблица 2

Нумерация последовательностей ДНК и аминокислотных последовательностей константных областей антител

Наименование последовательности	ДНК, SEQ ID NO.	Белок, SEQ ID NO.
IgHC	25	26
IgKC	27	28

Таблица 3

SEQ ID NO для аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1 и CDR3 легкой цепи антител против PD-1

Антитело	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
18040	29	30	31	32	33	34
18049	35	36	37	38	39	40
18098	41	42	43	44	45	46
18113	29	47	48	49	50	51
18201	52	53	54	38	45	55

18247	29	56	48	57	33	51
18250	58	59	60	57	33	34
18325	61	62	43	44	45	46
18366	63	64	65	32	33	34
18400	66	67	68	38	45	55
18413	69	70	71	72	45	73
18483	74	75	76	57	33	34

Пример 3. Мутации каркасных остатков в последовательностях антител.

Выравнивание аминокислотных последовательностей VH и VL из примера 2 с человеческими зародышевыми последовательностями проводили для выявления зародышевых генов, из которых происходят последовательности VH и VL. В табл. 4 показано приписывание наиболее близкого V- и J-зародышевого гена для VH и VL каждого клона, также как информация о мутациях каркасных остатков, как описано далее.

Поскольку гены антител выделяли посредством RT-ПЦР с использованием технологии выявления антител Symplex™ (Mejier et al., J. Mol. Biol., 358:764-772 (2006); WO 2005/042774) с вырожденными праймерами, шесть начальных аминокислот были подвержены возникновению мутаций, не возникающих в ходе созревания последовательности антитела. Таким образом, эти происходящие из праймеров мутации можно возвращать посредством мутагенеза к зародышевой последовательности без риска уменьшения аффинности связывания. Номера и специфические замены аминокислот VH и VL в этих "Symplex-корректированных" вариантах последовательностей показаны в табл. 4. Кроме того, антитела, несущие соматические гипермутации в каркасных областях переменных доменов, т.е. мутации в VH или VL вне CDR, можно возвращать к наиболее близкой зародышевой последовательности V- или J-. Номера и специфические замены аминокислот в каркасных областях антитела, которые можно заменять на зародышевые в этих "приближенных к зародышевым" вариантах последовательностей, также показаны в табл. 4. Очевидно, что "приближенные к зародышевым" варианты мутаций, показанные в табл. 4 (см. столбцы "Номера мутаций каркасных остатков VH в приближенном к зародышевому варианту" и "Количество мутаций каркасных остатков VH в приближенном к зародышевому варианту") включают любые "Symplex-корректированные" мутации, также как мутации вне начальных шести положений аминокислот.

Как отмечено выше, не ожидали, что изменение происходящих из вырожденных праймеров мутаций в первых аминокислотах в каждой последовательности VH или VL ухудшит свойства связывания по сравнению с исходным антителом. Таким образом, является предпочтительным, чтобы антитела против PD-1 по изобретению включали "Symplex-корректированные" мутации, указанные в таблицах ниже.

Как и для мутаций "приближенного к зародышевому варианту", находящихся вне начальных шести положений аминокислот каждой последовательности, можно выбирать любую одну или несколько из этих мутаций. Определение того, оказывает ли индивидуальная мутация отрицательный эффект на антигенсвязывающие свойства антитела, можно проводить посредством получения последовательностей приближенных к зародышевым вариантам VH и VL с указанной мутацией и сравнения антигенсвязывающих свойств антитела со свойствами предшественника с соответствующими исходными или Symplex-корректированными последовательностями. В случае, когда наблюдают уменьшение аффинности связывания или другое изменение свойств связывания, варианты, например, можно тестировать с помощью матрицы 2×2 VH/VL с использованием Symplex-корректированного варианта и приближенного к зародышевому варианту тяжелых и легких цепей каждого антитела, т.е. в этом случае четырех комбинаций для каждого антитела. Это позволяет определение того, одна, или другая, или обе из приближенных к зародышевым последовательностей VH и VL вносят вклад в любое из наблюдаемых измененных свойств связывания. Альтернативно или дополнительно серии соответствующих антител, в которых удалены отдельные мутации приближенного к зародышевому варианту, можно тестировать для определения специфических мутаций, которые влияют на связывание приближенного к зародышевому варианту, имеющего все перечисленные мутации.

В табл. 5 показаны номера последовательностей VH и VL для исходных последовательностей, так же как соответствующих Symplex-корректированных и приближенных к зародышевым вариантам. Из номеров в табл. 5 очевидно, что в некоторых случаях не существует различий между исходной последовательностью и Symplex-корректированной последовательностью или между Symplex-корректированной последовательностью и приближенной к зародышевой последовательностью. Мутации в зародышевых каркасных остатках основаны на определении IMGT. В прилагаемом списке последовательностей полученные замены аминокислот подчеркнуты и отмечены жирным шрифтом.

Таблица 4-1

Мутации каркасных остатков в последовательности VH

Антитело	Наиболее близкая V-, J-зародышевая последовательность	# VH FR мутаций в Symplex-корректированном варианте	VH FR мутации в Symplex-корректированном варианте	# VH FR мутаций в приближенном к зародышевому варианту	VH FR мутации в приближенном к зародышевому варианту
18040	IGHV3-11*01, IGHJ5*02	0		2	N35S, D84N
18049	IGHV3-33*04, IGHJ4*02	0		0	
18098	IGHV3-23*04, IGHJ3*02	2	Q1E, Q5V	9	Q1E, Q5V, R13Q, N35S, V46E, T50A, S77N, F80Y, T115M
18113	IGHV3-11*01, IGHJ5*02	0		1	A64V
18201	IGHV4-4*02, IGHJ3*02	1	V5Q	4	V5Q, T59N, R76K, M83L
18247	IGHV3-11*01, IGHJ4*02	0		2	D10G, R16G
18250	IGHV3-11*01, IGHJ4*03	1	Q5V	4	Q5V, H50Y, D59Y, V61A
18325	IGHV3-23*04, IGHJ3*02	3	Q1E, Q5V, Q6E	8	Q1E, Q5V, Q6E, N35S, A49S, T50A, G73D, M78T
18366	IGHV3-7*02, IGHJ5*02	2	Q1E, Q6E	2	Q1E, Q6E
18400	IGHV4-4*02, IGHJ3*02	1	L2V	6	L2V, K43G, V49I, S59N, M70I, P111Q
18413	IGHV3-23*04, IGHJ4*03	0		2	L48V, T50A
18483	IGHV3-7*02, IGHJ5*02	3	Q1E, Q5V, Q6E	4	Q1E, Q5V, Q6E, N35S

Таблица 4-2

Мутации каркасных остатков в последовательности VL

Антитело	Наиболее близкая V-, J-зародышевая последовательность	# VL FR мутаций в Symplex-корректированном варианте	VL FR мутация в Symplex-корректированном варианте	# VL FR мутаций в приближенном к зародышевому варианту	VL FR мутации в приближенном к зародышевому варианту
18040	IGKV4-1*01, IGKJ1*01	1	E1D	3	E1D, F40A, F55Y
18049	IGKV1-17*01, IGKJ1*01	2	E1D, V3Q	3	E1D, V3Q, N53S
18098	IGKV1D-12*01, IGKJ1*01	1	L4M	1	L4M
18113	IGKV4-1*01, IGKJ1*01	2	Q3V, L4M	3	Q3V, L4M, R69S
18201	IGKV1-6*01, IGKJ1*01	1	D1A	1	D1A
18247	IGKV4-1*01, IGKJ1*01	2	E1D, L4M	4	E1D, L4M, F55Y, F93Y
18250	IGKV4-1*01, IGKJ2*01	2	Q3V, L4M	3	Q3V, L4M, S55Y
18325	IGKV1D-12*02, IGKJ1*01	3	E1D, V3Q, L4M	3	E1D, V3Q, L4M
18366	IGKV4-1*01, IGKJ2*01	1	E1D	3	E1D, L40A, F55Y
18400	IGKV1-6*01, IGKJ1*01	2	E1A, V3Q	3	E1A, V3Q, P10S
18413	IGKV1D-12*01, IGKJ4*02	1	L4M	2	L4M, P12S
18483	IGKV4-1*01, IGKJ2*01	1	Q3V	3	Q3V, L40A, F55Y

Таблица 5

SEQ ID NO для аминокислотных последовательностей VH и VL антител против PD-1, включая Symplex-корректированные и приближенные к зародышевым варианты

Номер антитела	Номер белковой последовательности VH	Symplex-корректированный вариант VH	Приближенный к зародышевому варианту VH	Номер белковой последовательности VL	Symplex-корректированный вариант VL	Приближенный к зародышевому варианту VL
18040	1	1	96	2	84	106
18049	3	3	3	4	85	107
18098	5	77	97	6	86	86
18113	7	7	98	8	87	108
18201	9	78	99	10	88	88
18247	11	11	100	12	89	109
18250	13	79	101	14	90	110
18325	15	80	102	16	91	91
18366	17	81	81	18	92	111
18400	19	82	103	20	93	112
18413	21	21	104	22	94	113
18483	23	83	105	24	95	114

Пример 4. Анализ проточной цитометрии антител против PD-1 по активности блокирования PD-L1.

В этом примере описано тестирование антител против PD-1 по активности блокирования PD-L1 посредством проточной цитометрии.

Способы.

Активность блокирования лиганда PD-L1 исследовали в клеточном анализе, в котором осуществляли рекомбинантную экспрессию PD-1 человека на клетках CHO-S, и связывание меченного R-PE (R-фикоэритрином) химерного белка PD-L1-Fc человека анализировали посредством проточной цитометрии. Коммерчески доступный рекомбинантный химерный белок PD-L1-Fc (R&D Systems, USA) конъюгировали с R-PE с использованием набора для конъюгации R-фикоэритрина Lightning-Link® (Invivo Biosciences, UK). Клетки CHO-S временно трансфицировали для экспрессии PD-1 человека. Затем

клетки инкубировали с 50 мкл антитела против PD-1 при 20 мкг/мл на льду с последующим добавлением 50 мкл меченого R-PE PD-L1-Fc при приблизительно 3,4 мкг/мл (конечная концентрация 16,4 нМ) с дальнейшей инкубацией в течение дополнительных 20 мин (конечная концентрация антитела против PD-1: 10 мкг/мл). Связанное антитело детектировали с использованием APC (аллофикоцианина), конъюгированного с антителом против легкой цепи IgG человека. Связывание PD-L1 и антитела против PD-1 количественно оценивали посредством проточной цитометрии, детектирующей флуоресценцию R-PE и APC соответственно.

Результаты.

Результаты эксперимента по конкуренции представлены на фиг. 2А-2Н, где по X-оси (горизонтальной) показано связывание PD-L1, и по Y-оси (вертикальной) показано связывание IgG человека. Все тестированные антитела против PD-1 являлись способными ингибировать взаимодействие PD-1 с PD-L1 при конечной концентрации антитела 10 мкг/мл. Связывание PD-L1 с экспрессирующими PD-1 клетками в присутствии неспецифического антитела использовали в качестве отрицательного контроля для блокирования PD-L1. Кроме того, представлен репрезентативный график связывания PD-L1 в присутствии не блокирующего антитела.

Пример 5. Измерение аффинности антитела против PD-1 по отношению к антигену ECD PD-1 человека и яванского макака.

В этом примере показано, как двенадцать функциональных антител против PD-1 проявляют сильную аффинность связывания для PD-1 человека, с K_D в диапазоне от низкой нМ до промежуточной пМ. Те же самые антитела также вступают в перекрестную реакцию с PD-1 яванского макака с K_D в диапазоне от промежуточной до низкой нМ. Антитела 18201 и 18400 также вступают в перекрестную реакцию с PD-1 мыши с K_D в диапазоне от промежуточной до низкой нМ.

Способы.

Анализ кинетики связывания проводили посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием проточного устройства для нанесения микропятен Continuous Flow Microspotter (CFM, Wasatch Microfluidics, US) в сочетании с устройством Ibis MX96 SPR (IBIS Technologies, The Netherlands). Анализ визуализации поверхностного плазмонного резонанса проводили на сенсорах G-a-hu-IgG Fc SensEye® SPR (Ssens BV, The Netherlands). Антитела против PD-1, экспрессированные в формате IgG₁ LALA (т.е. имеющие мутации L234A/L235A), разводили до 2,5 нМ в PBS-T (1× PBS с 0,05% Tween 20, pH 7,4). Антитела наносили пятнами на G-a-hu-IgG Fc SensEye® в течение 15 мин с использованием Continuous Flow Microspotter (CFM, Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, US). После нанесения пятнами SensEye® располагали в биосенсоре IBIS MX96 и антитела химически фиксировали на поверхности сенсора с использованием набора Fix It (Ssens BV, The Netherlands). Анализ кинетики проводили с использованием серий кинетического титрования (Karlssoon et. al., Anal. Biochem., 349(1):136-47 (2006)), где мономерный антиген PD-1 инъецировали в увеличивающихся концентрациях от 2 нМ до 100 нМ без использования стадий регенерации поверхности после каждой инъекции антигена. Тестировали связывание с ECD PD-1 человека (Acro Biosystems, кат. № PD1-H52219), ECD PD-1 мыши (Sino Biological, кат. no. 50124-M08H) и ECD PD-1 яванского макака (Acro Biosystems, кат. № PD1-C5223) в трех отдельных экспериментах. Связывание антигена проводили в течение 15 мин и диссоциацию антигена проводили в течение 60 мин. Анализ кинетики проводили при 25°C. После завершения зарегистрированные ответы связывания приводили в соответствие с простой моделью связывания Ленгмюра 1:1 с использованием программного обеспечения Scrubber 2 для расчета констант скорости связывания (k_{on} или k_a), скорости диссоциации (k_{off} или k_d) и аффинности (K_D).

Результаты.

Результаты поверхностного плазмонного резонанса (SPR) показаны ниже в табл. 6. Как правило, антитела имели высокую аффинность и все тестированные антитела вступали в перекрестную реакцию с PD-1 яванского макака. Антитела 18201 и 18400 также вступали в перекрестную реакцию с PD-1 мыши, что указывает на то, что эпитопы, узнаваемые этими двумя антителами, являлись уникальными по сравнению с другими антителами против PD-1, включая эталонные антитела, пембролизумаб и ниволумаб, которые не вступали в перекрестную реакцию с PD-1 мыши. Эти свойства обеспечивают преимущества, поскольку они позволяют напрямую тестировать антитела в моделях на нечеловекообразных приматах или мышах до тестирования на субъектах-людях.

Таблица 6

Кинетика связывания антител против PD-1 с ECD PD-1 человека, яванского макака или мыши, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

Антитело	ECD PD-1	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)
18040	Человек	2,6E+05	1,1E-04	4,1E-10
18040	Яванский макак	3,4E+05	9,7E-04	2,9E-09
18040	Мышь	N.B.	N.B.	N.B.
18049	Человек	3,4E+04	6,0E-05	1,8E-09
18049	Яванский макак	3,8E+04	8,0E-05	2,1E-09
18049	Мышь	N.B.	N.B.	N.B.
18098	Человек	1,0E+05	2,3E-04	2,3E-09
18098	Яванский макак	3,9E+04	1,3E-03	3,4E-08
18098	Мышь	N.B.	N.B.	N.B.
18113	Человек	1,7E+05	1,0E-04	6,0E-10
18113	Яванский макак	1,4E+05	7,6E-04	5,3E-09
18113	Мышь	N.B.	N.B.	N.B.
18201	Человек	2,9E+05	1,3E-04	4,3E-10
18201	Яванский макак	1,9E+05	2,3E-04	1,2E-09
18201	Мышь	3,8E+04	7,3E-05	1,9E-09
18247	Человек	1,1E+05	1,5E-04	1,4E-09
18247	Яванский макак	9,8E+04	2,7E-03	2,8E-08
18247	Мышь	N.B.	N.B.	N.B.
18250	Человек	3,5E+05	2,9E-04	8,3E-10
18250	Яванский макак	2,8E+05	1,8E-03	6,4E-09
18250	Мышь	N.B.	N.B.	N.B.
18325	Человек	1,3E+05	1,1E-04	8,2E-10
18325	Яванский макак	1,4E+05	6,2E-04	4,3E-09
18325	Мышь	N.B.	N.B.	N.B.
18366	Человек	3,0E+05	4,0E-04	1,3E-09
18366	Яванский макак	2,2E+05	6,4E-03	2,9E-08
18366	Мышь	N.B.	N.B.	N.B.
18400	Человек	2,3E+05	3,5E-04	1,6E-09
18400	Яванский макак	2,3E+05	8,7E-04	3,7E-09
18400	Мышь	4,7E+03	5,0E-05	1,1E-08
18413	Человек	7,7E+04	1,1E-04	1,5E-09
18413	Яванский макак	9,7E+04	6,2E-04	6,4E-09
18413	Мышь	N.B.	N.B.	N.B.
18483	Человек	5,8E+05	1,7E-04	2,9E-10
18483	Яванский макак	2,6E+05	8,0E-04	3,1E-09
18483	Мышь	N.B.	N.B.	N.B.
аналог ниволумаба	Человек	2,4E+05	1,9E-04	8,0E-10
аналог ниволумаба	Яванский макак	4,1E+05	6,2E-04	1,5E-09
аналог ниволумаба	Мышь	N.B.	N.B.	N.B.
пембролизумаб/кейтруда	Человек	4,2E+05	1,4E-03	3,4E-09
пембролизумаб/кейтруда	Яванский макак	3,5E+05	1,3E-03	3,6E-09
пембролизумаб/кейтруда	Мышь	N.B.	N.B.	N.B.

N.B.=отсутствие связывания.

Пример 6. Функциональная оценка *in vitro* моноклональных антител против PD-1.

В этом примере показано, как двенадцать антител против PD-1 функционируют в двух различных функциональных анализах: анализе цельной крови с стафилококковым энтеротоксином В (SEB) и одно-

сторонней реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR). Способность этих двенадцати mAb против PD-1 стимулировать продукцию IL-2 в анализе обработанной SEB цельной крови или продукцию интерферона-гамма (IFN- γ) в анализе односторонней MLR оценивали, как описано ниже.

Способы.

SEB представляет собой суперантиген, который связывается с молекулами МНС класса II и специфическими областями V β Т-клеточных рецепторов (TCR), и управляет неспецифической стимуляцией Т-клеток. Это приводит к активации/пролиферации поликлональных Т-клеток и высвобождению цитокинов, включая IL-2 и IFN- γ . SEB добавляли при 1 мкг/мл в цельную кровь, и после двух суток культивирования, супернатанты собирали, и уровни IL-2 определяли посредством обычного ELISA.

В анализе односторонней MLR, дендритные клетки (DC) и положительные по CD4 (CD4⁺) Т-клетки, выделенные от двух различных здоровых доноров, совместно культивировали для индукции специфической для аллоантигена реакции, приводящей к продукции цитокинов и активации/пролиферации Т-клеток. Дендритные клетки подвергали дифференцировке из CD14⁺ моноцитов посредством шести суток культивирования с 20 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и 20 нг/мл интерлейкина-4 (IL-4), и смешивали в соотношении 1:10 с CD4⁺ Т-клетками, выделенными из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) из материала от здорового донора. После 5 суток культивирования, супернатанты собирали, и уровни IFN- γ определяли с использованием электрохемилюминесцентного анализа цитокинов Meso Scale (MSD).

Кривые зависимости ответа от дозы получали посредством двукратных разведений антитела с начальной концентрацией 50 мкг/мл.

Результаты.

Кривые зависимости ответа от дозы для двенадцати антител в анализе цельной крови с SEB и в анализе односторонней MLR показаны на фиг. 3A-3F и 4A-4F соответственно. Каждая точка на графике представляет среднее из трех повторов, где планки погрешностей представляют SEM. Обнаружено, что все из этих антител индуцируют зависимое от дозы увеличение продукции IL-2 в анализе цельной крови с SEB и продукции IFN- γ в анализе MLR.

Пример 7. Группировка эпитопов моноклональных антител против PD-1.

Этот пример иллюстрируют, как антитела против PD-1 группировали по эпитопным группам на основании паттернов попарной конкуренции. Антитела, принадлежащие различным эпитопным группам, узнают различные эпитопы на ECD PD-1.

Способы.

Исследование попарной конкуренции антител проводили посредством анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием Continuous Flow Microspotter (CFM) (Wasatch Microfluidics, US) в сочетании с устройством IBIS MX96 SPR (IBIS Technologies, The Netherlands). Анализ визуализации поверхностного плазмонного резонанса проводили на сенсоре G-a-hu-IgG Fc SensEye® SPR (Ssens BV, The Netherlands). Всего восемнадцать антител против PD-1 (человеческих, IgG1) разводили до 10 мкг/мл в буфере PBS, содержащем 0,05% Tween 20 (PBS-T), pH 7,0. Антитела фиксировали на поверхности сенсора против Fc посредством нанесения пятнами в течение 15 мин с использованием Continuous Flow Microspotter. После нанесения пятнами, SensEye® располагали в биосенсоре IBIS MX96, и оставшиеся сайты против Fc блокировали посредством инъекции 30 мкг/мл неспецифического человеческого IgG1. Связанные антитела конъюгировали с поверхностью с использованием набора FixIt (Ssens BV, The Netherlands). После подготовки сенсора, анализы конкуренции антител проводили с использованием классического сэндвич-анализа. Моновалентный антиген ECD PD-1 (Sino Biological, China) разводили в рабочем буфере HBS-EP и инъецировали в концентрации 50 нМ, и проводили связывание с конъюгированным массивом антител против PD-1. Затем проводили индивидуальные инъекции каждого из восемнадцати антител против PD-1, разведенных до 100 нМ в рабочем буфере HBS-EP, чтобы установить паттерны конкуренции антител. После каждого цикла конкуренции, поверхность сенсора регенерировали с использованием буфера 10 мМ Глицин HCl, pH 2,0.

Результаты.

Паттерн конкуренции восемнадцати антител против PD-1 представлен на фиг. 5. Для антител 12866 и 12807 не обнаружено наличия функциональной активности в анализах на основе клеток (данные не представлены), но они включены, поскольку узнают отдельные эпитопы, которые можно использовать для характеристики других эпитопных групп. Тестируемые антитела против PD-1 можно приписать двум не перекрывающимся эпитопным группам. Функциональные антитела, принадлежащие к эпитопной группе 1, все перекрестно блокировали друг друга, и их можно было далее разделить на подгруппы на основании блокирования антител 12866 и 12807. Например, антитела, блокирующие оба mAb 12866 и 12807, приписаны к эпитопной группе 1C. Эпитопная группа 1C включает антитела 18366, 18483, 18113, 18247, 18040 и 18250. Антитела в эпитопной группе 1D включают аналог ниволумаба ("Нивол") и 18049, и охарактеризованы по блокированию mAb 12866, но не 12807. Антитела, принадлежащие к эпитопной группе 1E, охарактеризованы только по блокированию mAb 12807. Эпитопная группа 1E включает аналог пембролизумаба ("Пемброл") и антитела 18098, 18201, 18400, 18413 и 18325.

Антитела 12760 и 13112 не блокируют лиганд PD-L1 и PD-L2, и приписаны к отдельной эпитопной группе 2, поскольку они перекрестно блокировали друг друга, но не блокировали связывание любого из антител из эпитопной группы 1. Антитела 12760 и 13112, вероятно, связываются с участком на PD-1, который не перекрывается с участком связывания лиганда PD-L1 и PD-L2.

Список последовательностей.

SEQ ID NO:1

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYM**X**WIRQAPGKGLEWVSYISSTGSTIY
YADSVKGRFTISRDNKNSLYLQ**M****X**SLRAEDTAVYYCARATNNGSDYWGQGTLVTVSS

X в положении 35 представляет собой N или S

X в положении 84 представляет собой D или N

SEQ ID NO:2

XIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYL**X**WYQQKPGQPPKLLI**X**WAST
RESGVPDRFSGSGSDTFTLTISLQAEADVAVYYCQYYSTPYTFGQGTKVEIK

X в положении 1 представляет собой E или D

X в положении 40 представляет собой F или A

X в положении 55 представляет собой F или Y

SEQ ID NO:3

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKLEWVAVIWIWDGSDKY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ**M**NSLRAEDTAVYYCAGGGNYGDFWQGTLVTVSS

SEQ ID NO:4

XI**X**MTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYVAS**X**LQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQYNSYPWTFGQGTKVEIK

X в положении 1 представляет собой E или D

X в положении 3 представляет собой V или Q

X в положении 53 представляет собой N или S

SEQ ID NO:5

XVQL**X**ESGGGLV**X**PGGSLRLSCAASGFTFSSFAM**X**WVRQAPGKGL**X**WVS**X**ITGGGTTSY
YADSVKGRFTISRDNK**X**TL**X**LQMNLSLRAEDTAVYYCAKWSWSAGAFDIWGQGT**X**VTVSS

X в положении 1 представляет собой Q или E

X в положении 5 представляет собой Q или V

X в положении 13 представляет собой R или Q

X в положении 35 представляет собой N или S

X в положении 46 представляет собой V или E

X в положении 50 представляет собой T или A

X в положении 77 представляет собой S или N

X в положении 80 представляет собой F или Y

X в положении 115 представляет собой T или M

SEQ ID NO:6

DIQ**X**TQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ**A**NSFPWTFGQGTKVEIK

X в положении 4 представляет собой L или M

SEQ ID NO:7

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKLEWVSYISSSGSTIY
YADSV**X**KGRFTISRDNKNSLYLQ**M**NSLRAEDTAVYYCARDTNWAFDYWGQGTLVTVSS

X в положении 64 представляет собой A или V

SEQ ID NO:8

DI**X****X**TQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYSSANNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWTST
RESGVPDRF**X**SGSGTDFTLTISLQAEADVAVYYCQ**F**YSTPRTFGQGTKVEIK

X в положении 3 представляет собой Q или V

X в положении 4 представляет собой L или M

X в положении 69 представляет собой R или S

SEQ ID NO:9

QVQL**X**ESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSNNWWSWVRQPPGKLEWIGEIYHDGTT**X**
YNPSLKSrvTISVDKS**X**NQFSLK**X**SSVTAADTAVYYCARGDWGSGAFDIWGQGTMTVTVSS

X в положении 5 представляет собой V или Q

X в положении 59 представляет собой T или N

X в положении 76 представляет собой R или K

X в положении 83 представляет собой M или L

SEQ ID NO:10

XIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQDYNYPRTFGQGTKVEIK

X в положении 1 представляет собой D или A

SEQ ID NO:11

QVQLVESGGGXLVKPGXSLRSLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTNWAFDYWGQGTLLVTVSS

X в положении 10 представляет собой D или G

X в положении 16 представляет собой R или G

SEQ ID NO:12

XIVXTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIXWASTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYXCQQFYSTPRTFGQGTKVEIK

X в положении 1 представляет собой E или D

X в положении 4 представляет собой L или M

X в положении 55 представляет собой F или Y

X в положении 93 представляет собой F или Y

SEQ ID NO:13

QVQLXESGGGLVKPGGSLRSLSCAASGFTFRDYMSWIRQAPGKGLEWVXISSSGSIIXYXDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTNWALDYWGQGTLLVTVSS

X в положении 5 представляет собой Q или V

X в положении 50 представляет собой H или Y

X в положении 59 представляет собой D или Y

X в положении 61 представляет собой V или A

SEQ ID NO:14

DIXTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIXWASTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYYCQQYYSTPYTFGQGTKLEIK

X в положении 3 представляет собой Q или V

X в положении 4 представляет собой L или M

X в положении 55 представляет собой S или Y

SEQ ID NO:15

XVQLXXSGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSSHVMXWVRQAPGKGLEWVXXISGSGVDIYYADSVKGRFTISRXNSKNXLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSWSAGAFDIWGQGTMTVTVSS

X в положении 1 представляет собой Q или E

X в положении 5 представляет собой Q или V

X в положении 6 представляет собой Q или E

X в положении 35 представляет собой N или S

X в положении 49 представляет собой A или S

X в положении 50 представляет собой T или A

X в положении 73 представляет собой G или D
X в положении 78 представляет собой M или T
SEQ ID NO:16

XIXTQSPSSVSASVGDVRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSPFWTFGQGTKVEIK

X в положении 1 представляет собой E или D
X в положении 3 представляет собой V или Q
X в положении 4 представляет собой L или M
SEQ ID NO:17

XVQLVXSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDQSEKY
YVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTNWGFNDWQGTGLVTVSS

X в положении 1 представляет собой Q или E
X в положении 6 представляет собой Q или E
SEQ ID NO:18

XIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLXWYQQKPGQPPKLLIXWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPYTFGQGTKLEIK

X в положении 1 представляет собой E или D
X в положении 40 представляет собой L или A
X в положении 55 представляет собой F или Y
SEQ ID NO:19

QXQLQESGPGLVKPSGTLISLTCVSGGSISSSNWMSWVRQPPXKGLEWXGEIFHDGTTX
YNPSLKSrvTXSVDKSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGNWSGALDIWGXGTMVTVSS

X в положении 2 представляет собой L или V
X в положении 43 представляет собой K или G
X в положении 49 представляет собой V или I
X в положении 59 представляет собой S или N
X в положении 70 представляет собой M или I
X в положении 111 представляет собой P или Q
SEQ ID NO:20

XIXMTQSPXLSASVGDVRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNYPRTFGQGTKVEIK

X в положении 1 представляет собой E или A
X в положении 3 представляет собой V или Q
X в положении 10 представляет собой P или S
SEQ ID NO:21

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFMMSWVRQAPGKGLEWXSXISGGGGSTY
YVDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWDLYYFDYWGQGTGLVTVSS

X в положении 48 представляет собой L или V
X в положении 50 представляет собой T или A
SEQ ID NO:22

DIQXTQSPSSVXASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVEIK

X в положении 4 представляет собой L или M

X в положении 12 представляет собой P или S

SEQ ID NO:23

XVQLXXSGGGLVQPPGSLRLSACAASGFTFSDYWMXWVRQAPGKGLEWVANIKEDGNEKY
YVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDTNWGSYDWGQGTILVTVSS

X в положении 1 представляет собой Q или E

X в положении 5 представляет собой Q или V

X в положении 6 представляет собой Q или E

X в положении 35 представляет собой N или S

SEQ ID NO:24

DI~~X~~MTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYSSNNKNYL~~X~~WYQQKPGQPPKLLI~~X~~WAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYSTPYTFGQGTKLEIK

X в положении 3 представляет собой Q или V

X в положении 40 представляет собой L или A

X в положении 55 представляет собой F или Y

Константные последовательности антител.

SEQ ID NO:25 (последовательность ДНК IgHC)

GCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG
GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGG
AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCT
ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA
CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA
ACTCACACATGCCACCGTGCACAGCCTGAAGCCGCCGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC
CCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGA
CGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT
GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGGCTCCACCG
TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCC
AGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC
CTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
TCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGAC
CACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT
ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTA

SEQ ID NO:26 (белковая последовательность IgHC)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL

VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:27 (последовательность ДНК IgK)

CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATC
TGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG
AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGG
ACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT
CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA
GAGTGT

SEQ ID NO:28 (белковая последовательность IgK)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:29 (18040/18113/18247 H-CDR1)

GFTFSDYY

SEQ ID NO:30 (18040 H-CDR2)

ISSTGSTI

SEQ ID NO:31 (18040 H-CDR3)

CARATNWGSDY

SEQ ID NO:32 (18040/18366 L-CDR1)

QSVLYSSNNKNY

SEQ ID NO:33 (18040/18247/18250/18366/18483 L-CDR2)

WAS

SEQ ID NO:34 (18040/18250/18366/18483 L-CDR3)

CQQYYSTPYT

SEQ ID NO:35 (18049 H-CDR1)

GFTFSNYG

SEQ ID NO:36 (18049 H-CDR2)

IWYDGS DK

SEQ ID NO:37 (18049 H-CDR3)

CAGGGNYYGDF

SEQ ID NO:38 (18049/18201/18400 L-CDR1)

QGIRND

SEQ ID NO:39 (18049 L-CDR2)

VAS

SEQ ID NO:40 (18049 L-CDR3)

CLQYNSYPWT

SEQ ID NO:41 (18098 H-CDR1)

GFTFSSFA

SEQ ID NO:42 (18098 H-CDR2)

ITGGGTTS

043633

SEQ ID NO:43 (18098/18325 H-CDR3)
CAKWGSWSAGAFDI
SEQ ID NO:44 (18098/18325 L-CDR1)
QGISSW
SEQ ID NO:45 (18098/18201/18325/18400/18413 L-CDR2)
AAS
SEQ ID NO:46 (18098/18325 L-CDR3)
CQQANSFPWT
SEQ ID NO:47 (18113 H-CDR2)
ISSSGSTI
SEQ ID NO:48 (18113/18247 H-CDR3)
CARDTNWAFDY
SEQ ID NO:49 (18113 L-CDR1)
QSVFYSSNNKKNY
SEQ ID NO:50 (18113 L-CDR2)
WTS
SEQ ID NO:51 (18113/18247 L-CDR3)
CQQFYSTPRT
SEQ ID NO:52 (18201 H-CDR1)
GGSISSNNW
SEQ ID NO:53 (18201 H-CDR2)
IYHDGTT
SEQ ID NO:54 (18201 H-CDR3)
CARGDWGSGAFDI
SEQ ID NO:55 (18201/18400 L-CDR3)
CLQDYNYPRT
SEQ ID NO:56 (18247 H-CDR2)
ISSSSSTI
SEQ ID NO:57 (18247/18250/18483 L-CDR1)
QSVFYSSNNKKNY
SEQ ID NO:58 (18250 H-CDR1)
GFTFRDYY
SEQ ID NO:59 (18250 H-CDR2)
ISSSGSII
SEQ ID NO:60 (18250 H-CDR3)
CARDTNWALDY
SEQ ID NO:61 (18325 H-CDR1)
GFTFSSHV
SEQ ID NO:62 (18325 H-CDR2)
ISGSGVDT

SEQ ID NO:63 (18366 H-CDR1)
 GFTFSSYW
 SEQ ID NO:64 (18366 H-CDR2)
 IKQDGSEK
 SEQ ID NO:65 (18366 H-CDR3)
 CARDTNWGFND
 SEQ ID NO:66 (18400 H-CDR1)
 GGSISSSNW
 SEQ ID NO:67 (18400 H-CDR2)
 IFHDGTT
 SEQ ID NO:68 (18400 H-CDR3)
 CARGNWGSGALDI
 SEQ ID NO:69 (18413 H-CDR1)
 GFTFSSFV
 SEQ ID NO:70 (18413 H-CDR2)
 ISGGGGST
 SEQ ID NO:71 (18413 H-CDR3)
 CAKDWDLYYFDY
 SEQ ID NO:72 (18413 L-CDR1)
 QGISNW
 SEQ ID NO:73 (18413 L-CDR3)
 CQQANSFPLT
 SEQ ID NO:74 (18483 H-CDR1)
 GFTFSDYW
 SEQ ID NO:75 (18483 H-CDR2)
 IKEDGNEK
 SEQ ID NO:76 (18483 H-CDR3)
 CARDTNWGS DY
 SEQ ID NO:77

EVQLVESGGGGLVQPPGSLRLS CAASGFTFSSFAMSWVRQAPGKGLVWVSTITGGGTTSSYY
 ADSVKGRFTISRDNKSTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAKWGSWSAGAFDIWGQGTMTVSS

SEQ ID NO:78

QVQLQESGPGPLVKPSGTLTLTCAVSGGSISSNNWWSWVRQPPGKGLEWIGEIYHDGTTTY
 NPSLKSRVTISVDKSRNQFSLKMSVTAADTAVYYCARGDWGSGAFDIWGQGTMTVSS

SEQ ID NO:79

QVQLVESGGGGLVKPPGSLRLS CAASGFTFRDYYSWIRQAPGKGLEWVSHISSSGSIIDY
 VDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTNWALDYWGQGTMTVSS

SEQ ID NO:80

EVQLVESGGGGLVQPPGSLRLS CAASGFTFSSHVMNWVRQAPGKGLEWVATISGSGVDTTY
 ADSVKGRFTISRGNMMLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWGSWSAGAFDIWGQGTMTVSS

SEQ ID NO:81

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYY
VDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTNWGFNWDWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:82

QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSNWWSWVRQPPKKGLEWVGEIFHDGTTSY
NPSLKSRVTMSVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGNWGSGALDIWPGMTMVTVSS

SEQ ID NO:83

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMNWRQAPGKGLEWVANIKEDGNEKYY
VDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTNWGSYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:84

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLFWYQQKPGQPPKLLIFWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPYTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:85

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYVASNLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYNSYPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:86

DIQLTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:87

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYSSANNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWSTR
ESGVPDRFRGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQFYSTPRTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:88

AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQDYNYPRTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:89

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIFWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYFCQQFYSTPRTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:90

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLISWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:91

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:92

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLLWYQQKPGQPPKLLIFWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:93

AIQMTQSPSPLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQDYNYPRTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:94

DIQLTQSPSSVPASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQOKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGKVEIK

SEQ ID NO:95

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYSSNNKNYLLWYQOKPGQPPKLLIFWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:96

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSTGSTIYY
ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARATNWGSDYWGQGTLTVSS

SEQ ID NO:97

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAITGGGTSYY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWGSWSAGAFDIWGQGTMTVSS

SEQ ID NO:98

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYY
ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTNWAFDYWGQGTLTVSS

SEQ ID NO:99

QVQLQESGPGLVKPSGTLTLTCAVSGGSISSNNWWSWVRQPPGKGLEWIGEIYHDGTTN
NPSLKSRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGDWGSGAFDIWGQGTMTVSS

SEQ ID NO:100

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYY
ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTNWAFDYWGQGTLTVSS

SEQ ID NO:101

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRDYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSIY
ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTNWALDYWGQGTLTVSS

SEQ ID NO:102

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHVMNWVRQAPGKGLEWVSAISGSGVDTTY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWGSWSAGAFDIWGQGTMTVSS

SEQ ID NO:103

QVQLQESGPGLVKPSGTLTLTCAVSGGSISSNNWWSWVRQPPGKGLEWIGEIFHDGTTN
NPSLKSRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGNWGSGALDIWGQGTMTVSS

SEQ ID NO:104

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFVMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGGSTYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWDLYYFDYWGQGTLTVSS

SEQ ID NO:105

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKEDGNEKYY
VDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTNWGSYWGQGTLTVSS

SEQ ID NO:106

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQOKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPYTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:107

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQIRNDLGWYQOKPGKAPKRLIYVASSLQSGVPS

RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYNSYPWTFGQGTKVEIK
 SEQ ID NO:108
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYSSNKNYLA~~W~~YQQKPGQPPKLLIY~~W~~STR
 ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ~~Q~~FYSTPRTFGQGTKVEIK
 SEQ ID NO:109
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYSSNKNYLA~~W~~YQQKPGQPPKLLIY~~W~~ASTR
 ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC~~Q~~Q~~Q~~FYSTPRTFGQGTKVEIK
 SEQ ID NO:110
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYSSNKNYLA~~W~~YQQKPGQPPKLLIY~~W~~ASTR
 ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ~~Q~~Y~~Y~~STPYTFGQGTKLEIK
 SEQ ID NO:111
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNYLA~~W~~YQQKPGQPPKLLIY~~W~~ASTR
 ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ~~Q~~Y~~Y~~STPYTFGQGTKLEIK
 SEQ ID NO:112
 AIQMTQSPSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNYPRTFGQGTKVEIK
 SEQ ID NO:113
 DIQLTQSPSSV~~P~~ASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ~~Q~~ANSFPLTFGGGKVEIK
 SEQ ID NO:114
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYSSNKNYLA~~W~~YQQKPGQPPKLLIY~~W~~ASTR
 ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ~~Q~~Y~~Y~~STPYTFGQGTKLEIK
 SEQ ID NO:115
 GGGGSGGGSGGGGS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть, где указанное антитело содержит аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3: SEQ ID NO: 52, 53, 54, 38, 45 и 55 соответственно.

2. Антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, где указанные вариабельные домены тяжелой и легкой цепей имеют аминокислотные последовательности, выбранные из

- SEQ ID NO: 9 и 10 соответственно;
- SEQ ID NO: 78 и 10 соответственно;
- SEQ ID NO: 99 и 10 соответственно;
- SEQ ID NO: 9 и 88 соответственно;
- SEQ ID NO: 78 и 88 соответственно; или
- SEQ ID NO: 99 и 88 соответственно.

3. Антитело против PD-1 по п.1 или 2, где

- антитело принадлежит изотипу IgG подкласса IgG1, где один или оба аминокислотных остатка в положениях 234 и 235 подвергнуты мутагенезу до Ala; или
- антитело принадлежит изотипу IgG подкласса IgG1, где аминокислотный остаток в положении 228 подвергнут мутагенезу до Pro, где остатки нумерованы согласно схеме нумерации IMGT®.

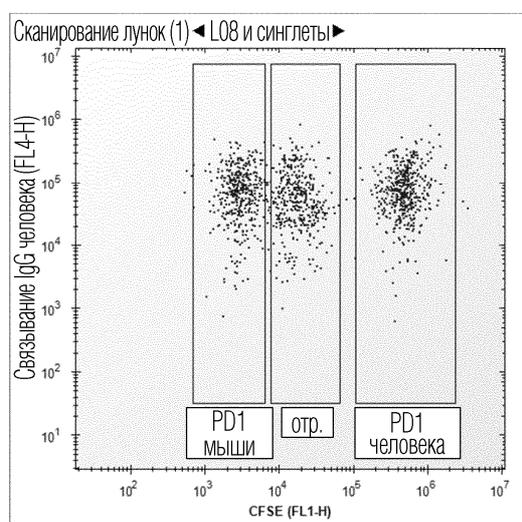
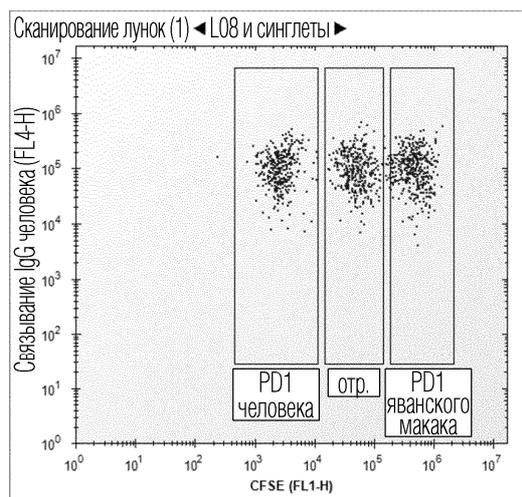
4. Антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-3, где антитело или часть имеет по меньшей мере одно из следующих свойств:

- связывается с PD-1 яванского макака с K_D 4×10^{-8} М или менее;
- связывается с PD-1 мыши с K_D 2×10^{-8} М или менее;
- связывается с PD-1 человека с K_D 3×10^{-9} М или менее;
- ингибирует взаимодействие PD-1 с PD-L1 в концентрации 10 мкг/мл;
- стимулирует продукцию IL-2 в анализе цельной крови с SEB; и
- стимулирует продукцию IFN- γ в анализе односторонней реакции смешанной культуры лимфоцитов.

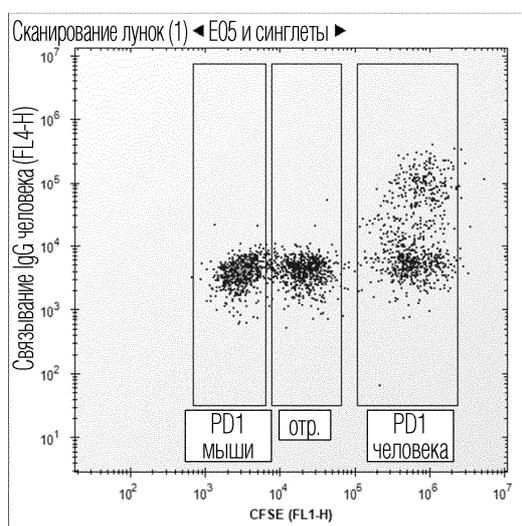
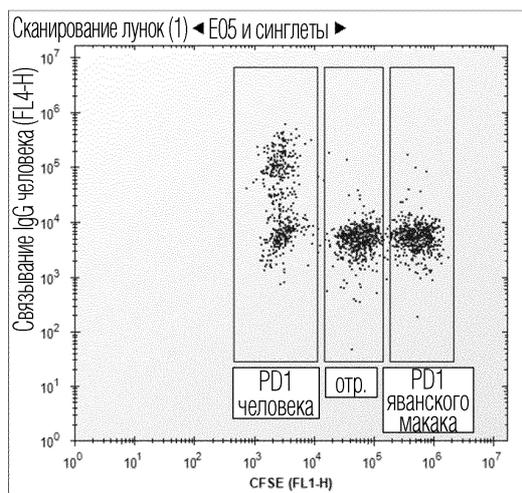
5. Антитело против PD-1, которое содержит

- НС с аминокислотными последовательностями из SEQ ID NO: 9 и 26 и LC с аминокислотными последовательностями из SEQ ID NO: 10 и 28;
- НС с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 78 и 26 и LC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 10 и 28;

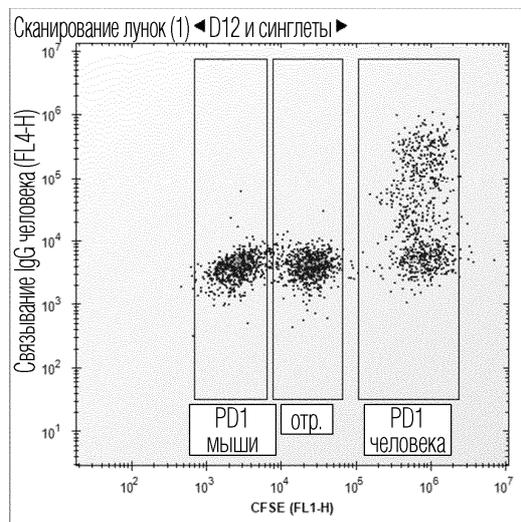
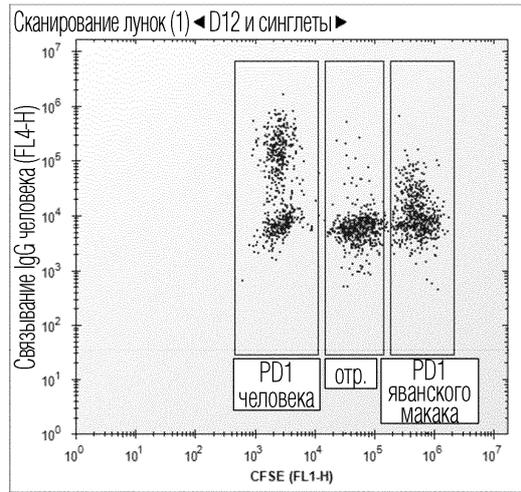
- с) НС с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 99 и 26 и LC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 10 и 28;
- д) НС с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 9 и 26 и LC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 88 и 28;
- е) НС с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 78 и 26 и LC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 88 и 28; или
- ф) НС с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 99 и 26 и LC с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 88 и 28.
6. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело против PD-1 или его антигенсвязывающую часть по любому из пп.1-5 и фармацевтически приемлемый наполнитель.
7. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь, и нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь, антитела против PD-1 или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-5.
8. Вектор экспрессии, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.7, где указанный вектор дополнительно содержит последовательность для контроля экспрессии.
9. Клетка-хозяин, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь, и нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь, антитела против PD-1 или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-5.
10. Способ получения антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-5, включающий получение клетки-хозяина по п.9, культивирование указанной клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии антитела или части, и выделение полученных антитела или части.
11. Биспецифическая связывающая молекула, отличающаяся тем, что она содержит связывающий домен антитела по п.1.
12. Способ усиления иммунитета у пациента, включающий введение указанному пациенту антитела против PD-1 или антигенсвязывающей части по любому из пп.1-5, фармацевтической композиции по п.6 или биспецифической связывающей молекулы по п.11.
13. Способ лечения злокачественной опухоли у пациента, включающий введение указанному пациенту антитела против PD-1 или антигенсвязывающей части по любому из пп.1-5, фармацевтической композиции по п.6 или биспецифической связывающей молекулы по п.11.
14. Способ по п.13, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из находящейся на поздних стадиях или метастазирующей меланомы, немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, рака желудка, почечноклеточного рака, печеночноклеточной карциномы, колоректального рака и лимфомы Ходжкина.
15. Способ по любому из пп.12-14, дополнительно включающий введение пациенту иммуностимулирующего средства, вакцины, химиотерапевтического средства, антинеопластического средства, антиангиогенного средства, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора пути PD-1 или радиотерапии.



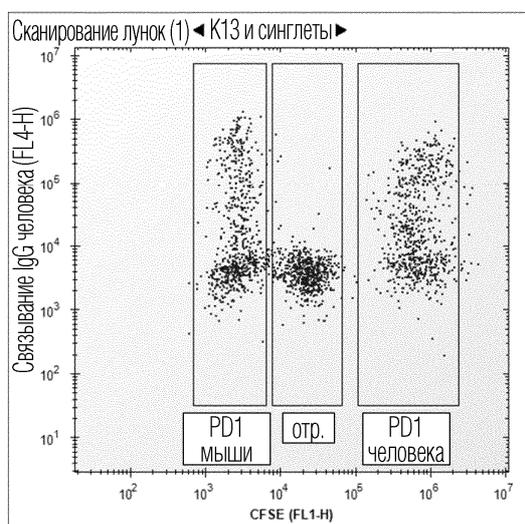
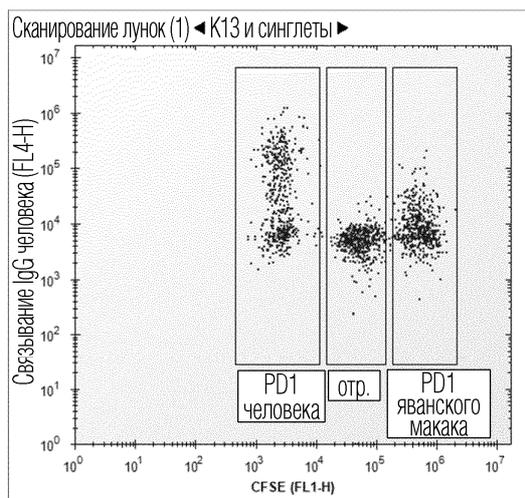
Фиг. 1А



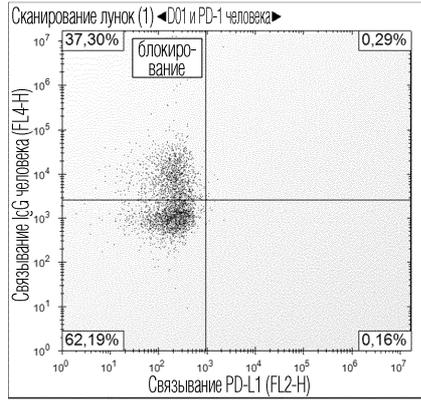
Фиг. 1В



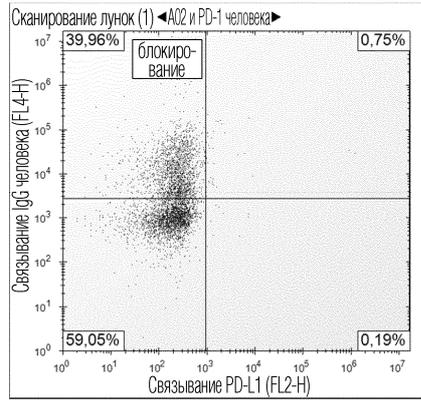
Фиг. 1С



Фиг. 1D

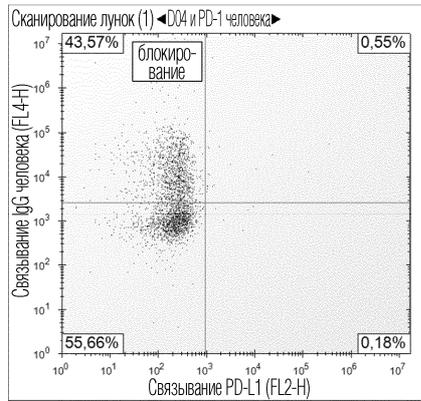


18040

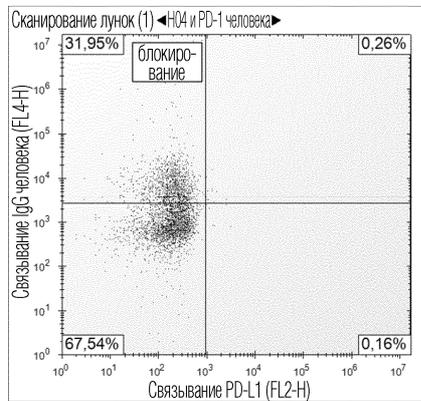


18049

Фиг. 2А

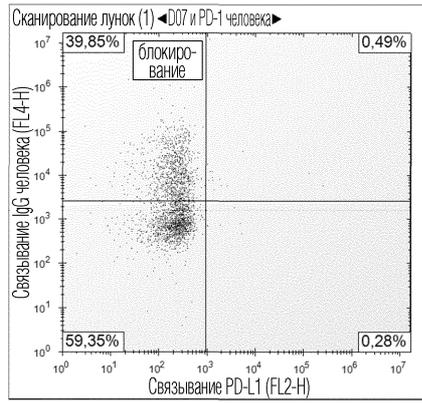


18098

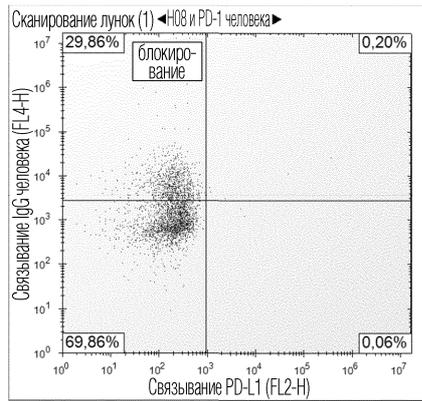


18113

Фиг. 2В

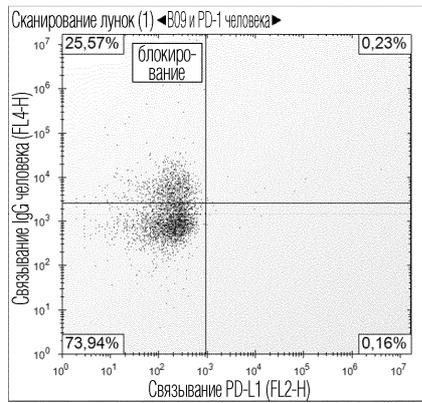


18201

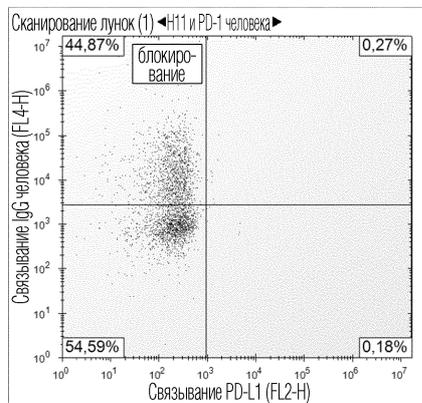


18247

Фиг. 2С

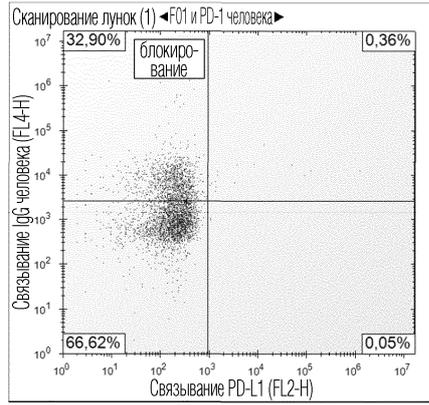


18250

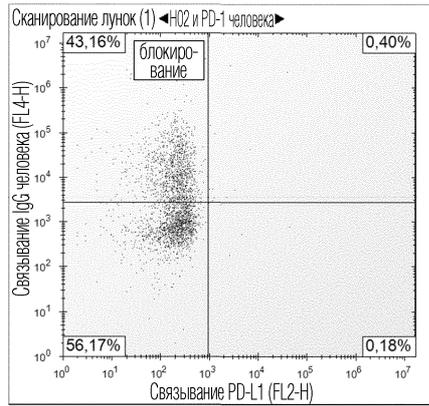


18325

Фиг. 2D

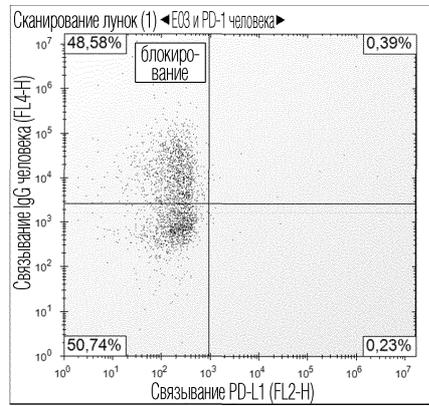


18366

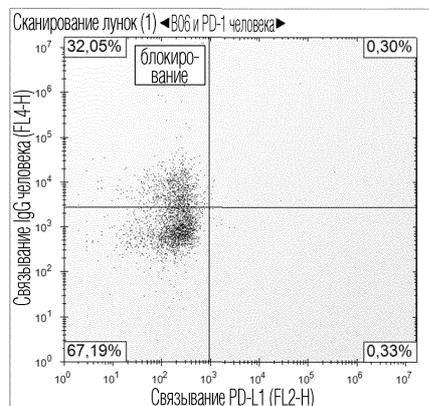


18400

Фиг. 2Е



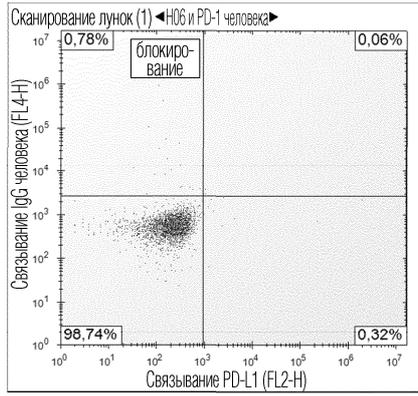
18413



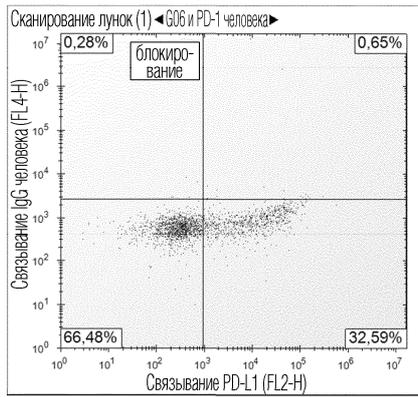
18483

Фиг. 2F

043633

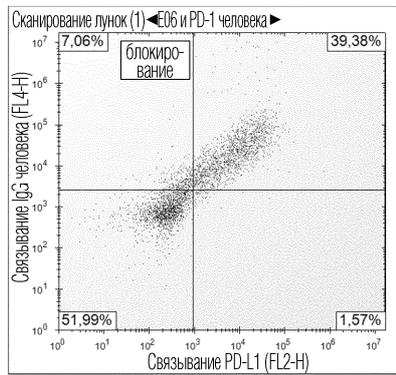


без PD-L1-PE
без mAb



контрольное mAb

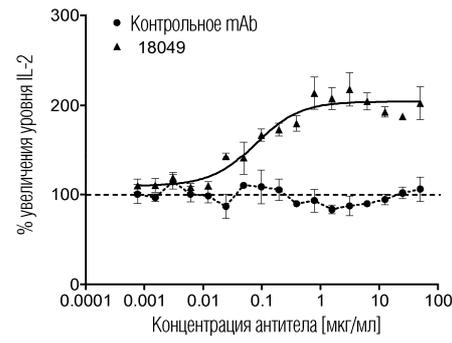
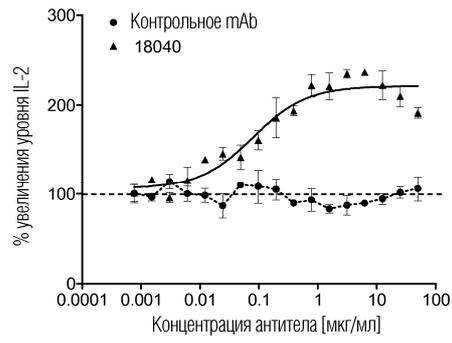
Фиг. 2G



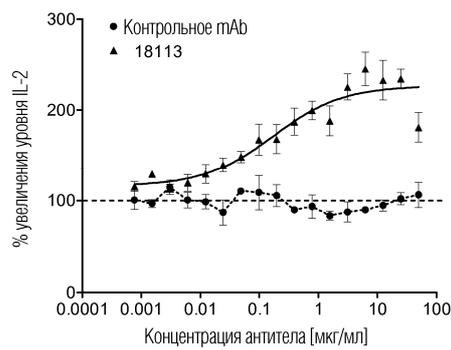
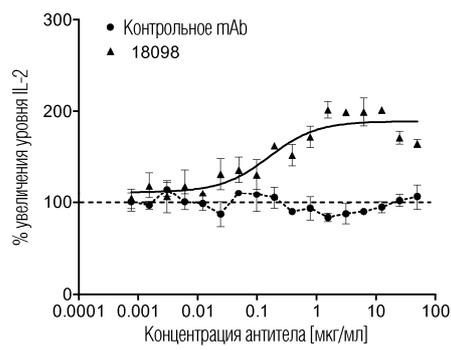
не блокирующее mAb

Фиг. 2H

043633

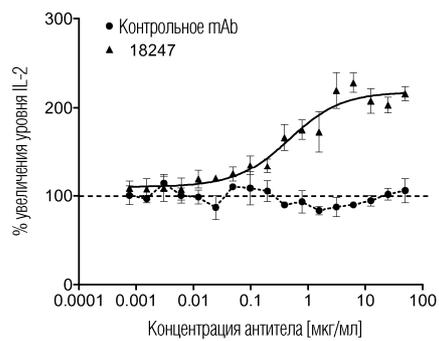
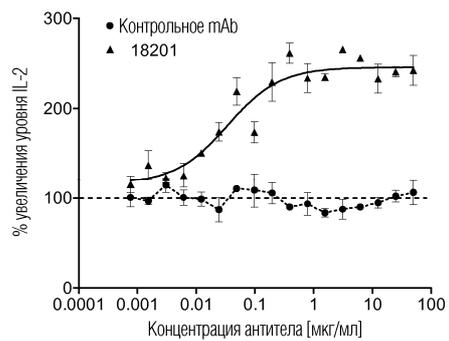


Фиг. 3А

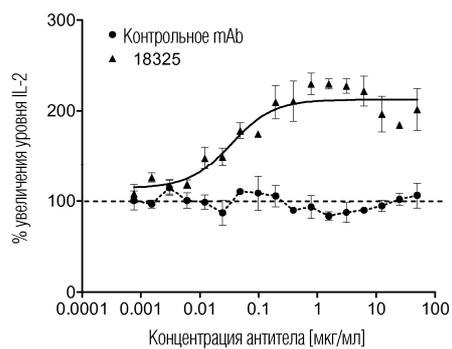
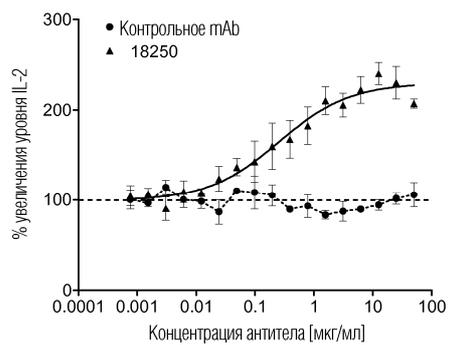


Фиг. 3В

043633

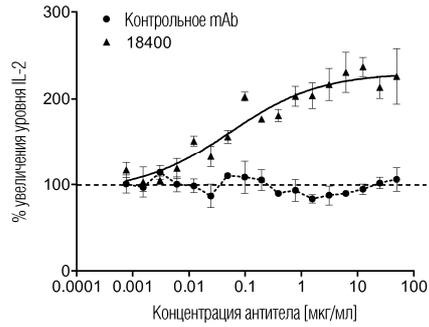
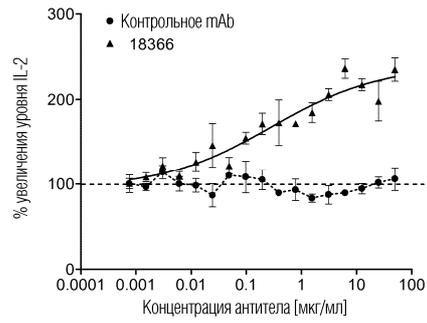


Фиг. 3С

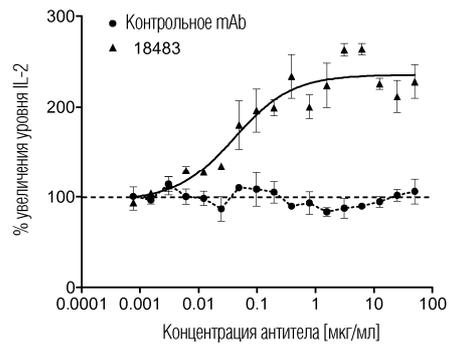
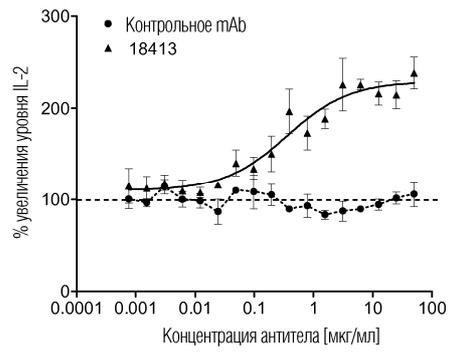


Фиг. 3D

043633

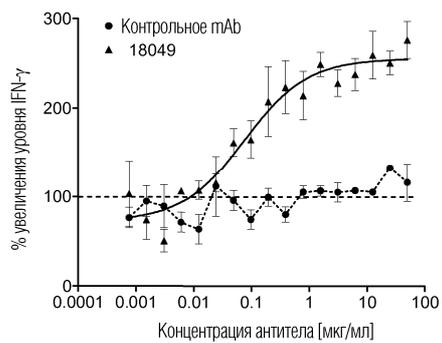
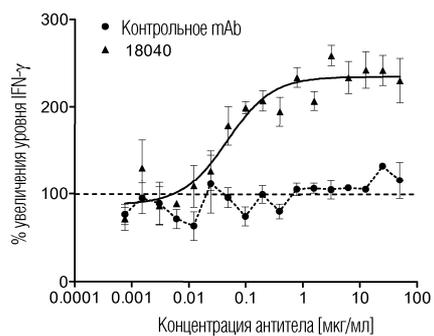


Фиг. 3Е

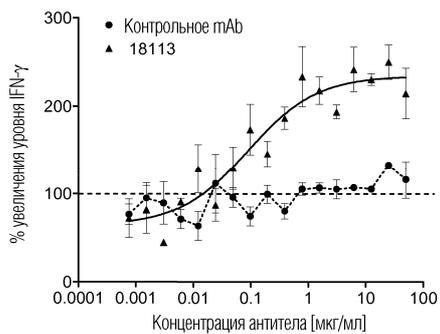
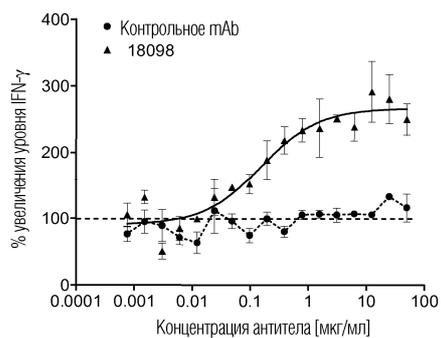


Фиг. 3F

043633

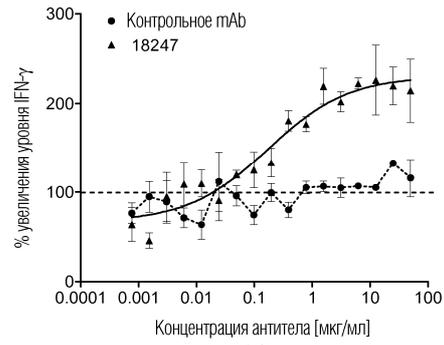
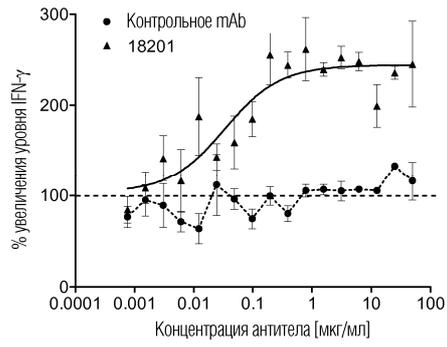


Фиг. 4А

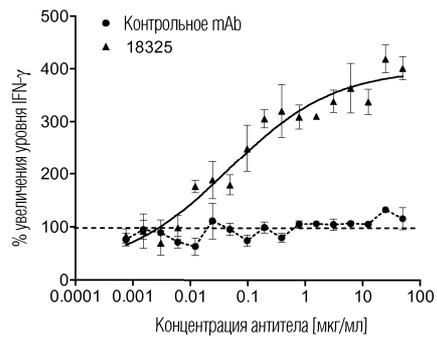
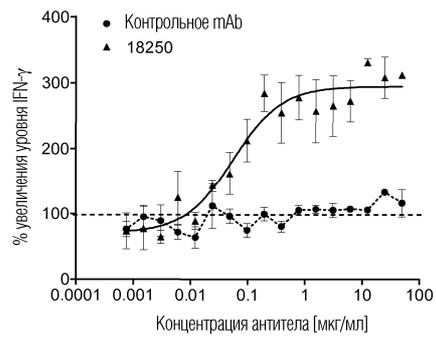


Фиг. 4В

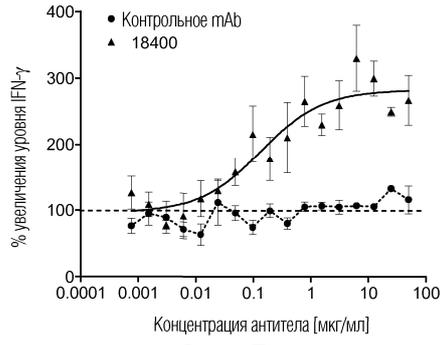
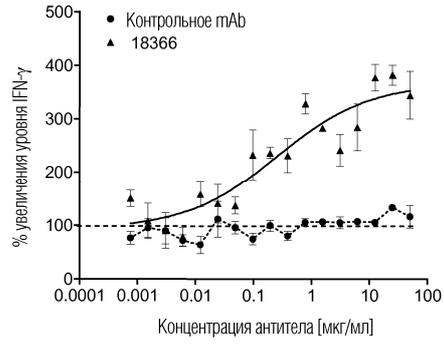
043633



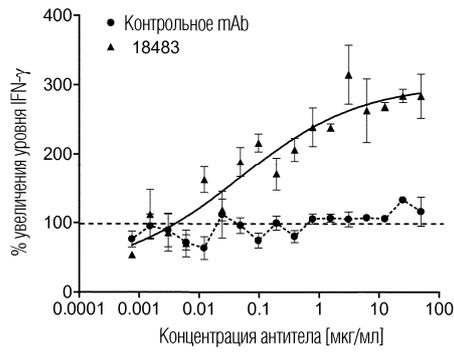
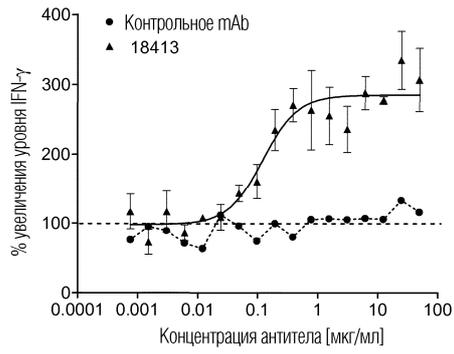
Фиг. 4С



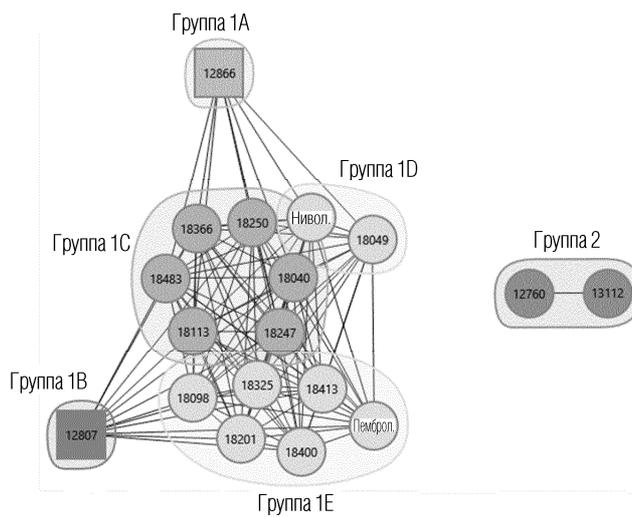
Фиг. 4D



Фиг. 4Е



Фиг. 4F



Фиг. 5

