

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491301** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.09.24

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.11.17

(54) **СКОНСТРУИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К PD-1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **63/281,404**

(71) Заявитель:
МИРОБИО ЛИМИТЕД (GB)

(32) **2021.11.19**

(33) **US**

(72) Изобретатель:
Палух Кристофер, Мюррей Линн (GB)

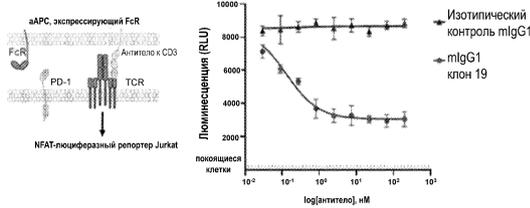
(86) **PCT/IB2022/000705**

(87) **WO 2023/089377 2023.05.25**

(88) **2023.07.13**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В некоторых аспектах в данном документе представлены антитела, которые связываются с PD-1. Антитела, представленные в данном документе, в некоторых случаях агонизируют передачу сигналов PD-1. Антитела, представленные в данном документе, в некоторых случаях имеют модифицированную Fc-область. В других аспектах в данном документе представлены композиции, способы применения, способы получения и наборы, относящиеся к антителам, которые связываются с PD-1.



202491301 A1

202491301 A1

СКОНСТРУИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К PD-1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

[0001] Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета по предварительной заявке на патент США № 63/281,404, поданной 19 ноября 2021 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронной форме в формате XML и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Копия указанного перечня в формате XML, созданная 7 ноября 2022 г., называется 56270_718601_SL.txt и имеет размер 19 479 байт.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] В данном документе в некоторых аспектах раскрыт способ подавления иммунной клетки, которая экспрессирует белок программируемой смерти 1 (PD-1), включающий приведение иммунной клетки в контакт с антителом, которое специфически связывается с PD-1, и агонизирует передачу сигналов PD-1 в иммунной клетке, при этом антитело содержит Fc-область, которая содержит аминокислотную замену, и при этом аминокислотная замена приводит к снижению зависимой от антитела клеточной цитотоксичности (ADCC) против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки у субъекта по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит аминокислотную замену, и при этом антитело оказывает такой же или более высокий агонистический эффект на передачу сигналов PD-1 в иммунной клетке по сравнению с исходной молекулой.

[0004] В некоторых аспектах в данном документе раскрыт способ подавления иммунной клетки, которая экспрессирует белок программируемой смерти 1 (PD-1), включающий приведение иммунной клетки в контакт с антителом, которое специфически связывается с PD-1, и которое усиливает взаимодействие PD-1 на поверхности иммунной клетки с PD-L1. В некоторых случаях антитело содержит Fc-область, и при этом Fc-область содержит аминокислотную замену. В некоторых случаях аминокислотная замена приводит к снижению зависимой от антитела клеточной цитотоксичности (ADCC) против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки у субъекта по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит аминокислотную замену, и при этом антитело имеет тот же или более высокий агонистический эффект на передачу сигналов PD-1 в иммунной клетке по сравнению с исходной молекулой.

[0005] В некоторых вариантах осуществления способа ADCC против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки снижается, что определено с помощью анализа активации натуральных клеток-киллеров, как описано в примере 7.

[0006] В некоторых вариантах осуществления способа антитело не приводит к значительной ADCC против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки, что определено с помощью анализа активации натуральных клеток-киллеров, как описано в примере 7.

[0007] В некоторых вариантах осуществления способа антитело не активирует натуральные клетки-киллеры (NK).

[0008] В некоторых вариантах осуществления способа антитело содержит тяжелую цепь, которая содержит переменную область тяжелой цепи, и легкую цепь, которая содержит переменную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления способа переменная область тяжелой цепи содержит определяющую комплементарность область (CDR), содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 1–3, с 0–3 аминокислотными модификациями.

[0009] В некоторых вариантах осуществления способа Fc-область получена из IgG1 и содержит аспарагиновую кислоту (D) в положении 238, пронумерованном в соответствии с нумерацией EU.

[0010] В данном документе раскрыт в некоторых аспектах способ подавления иммунной клетки, которая экспрессирует белок программируемой смерти 1 (PD-1), включающий приведение иммунной клетки в контакт с антителом, которое содержит тяжелую цепь, легкую цепь и Fc-область, где (i) тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 1–3, с 0–3 аминокислотными модификациями; (ii) легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, которая содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 4–6, с 0–3 аминокислотными модификациями; и (iii) Fc-область получена из IgG1 и содержит аспарагиновую кислоту (D) в положении 238, пронумерованном в соответствии с нумерацией EU.

[0011] В некоторых вариантах осуществления способа переменная область легкой цепи содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 4–6, с 0–3 аминокислотными модификациями.

[0012] В некоторых вариантах осуществления способа переменная область тяжелой цепи содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDRH1), CDRH2 и CDRH3, и при этом CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат последовательность,

представленную под SEQ ID NO: 1–3, соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями.

[0013] В некоторых вариантах осуществления способа переменная область легкой цепи содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDRL1), CDRL2 и CDRL3, и при этом CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4–6, соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями.

[0014] В некоторых вариантах осуществления способа переменная область тяжелой цепи содержит CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и при этом CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1-3 соответственно.

[0015] В некоторых вариантах осуществления способа переменная область легкой цепи содержит CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и при этом CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4–6, соответственно.

[0016] В некоторых вариантах осуществления способа переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 7–11.

[0017] В некоторых вариантах осуществления способа переменная область легкой цепи содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 12–16.

[0018] В некоторых вариантах осуществления способа тяжелая цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 18.

[0019] В некоторых вариантах осуществления способа легкая цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 19.

[0020] В некоторых вариантах осуществления способа Fc-область получена из IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления способа Fc-область содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 17.

[0021] В некоторых вариантах осуществления способа переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи образуют структуру, выбранную из группы, состоящей из scFv, sc(Fv)₂, dsFv, Fab, Fab', (Fab')₂ и димера.

[0022] В некоторых вариантах осуществления способа переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи образуют одноцепочечный переменный фрагмент (ScFv), который функционально связан с Fc-областью.

[0023] В некоторых вариантах осуществления способа антитело выбрано из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела и мультиспецифического антитела. В некоторых вариантах осуществления способа антитело является моноклональным.

[0024] В некоторых вариантах осуществления способа антитело снижает активацию иммунной клетки по меньшей мере на около 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% или 50%.

[0025] В некоторых вариантах осуществления способа антитело снижает активацию иммунной клетки на от около 10% до 50%, от 10% до 40%, от 10% до 30%, от 10% до 20%, от 10% до 15%, от 20% до 50%, от 20% до 40% или от 20% до 30%.

[0026] В некоторых вариантах осуществления способа иммунная клетка включает Т-клетку, В-клетку или макрофаг. В некоторых вариантах осуществления способа иммунная клетка включает антиген-специфическую Т-клетку.

[0027] В некоторых вариантах осуществления способа Fc-область селективно связывается с FcγR2B. В некоторых вариантах осуществления способа антитело связывается с FcγR2B человека с KD менее 5 мкМ, 4 мкМ, 3 мкМ или 2 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С. В некоторых вариантах осуществления способа антитело связывается с FcγR2A человека (аллотип 131R) с KD более 5 мкМ или 10 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С. В некоторых вариантах осуществления способа антитело связывается с FcγR2A человека (аллотип 131R) с KD по меньшей мере 15 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С. В некоторых вариантах осуществления способа антитело связывается с FcγR2A человека (аллотип 131H) с KD по меньшей мере 50 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С. В некоторых вариантах осуществления способа антитело связывается с FcγR2A человека (аллотип 131H) с KD по меньшей мере 80 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С. В некоторых вариантах осуществления способа соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131R) составляет по меньшей мере 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 или 6:1. В некоторых вариантах осуществления способа соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131R) составляет по меньшей мере 6:1. В некоторых вариантах осуществления способа соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности

связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131R) составляет около 6:1. В некоторых вариантах осуществления способа соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131H) составляет по меньшей мере 10:1, 15:1, 20:1, 40:1 или 50:1. В некоторых вариантах осуществления способа соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131H) составляет по меньшей мере 40:1. В некоторых вариантах осуществления способа соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131H) составляет около 40:1. В некоторых вариантах осуществления способа соотношение определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °C.

[0028] В данном документе в некоторых аспектах раскрыто выделенное антитело, которое специфически связывается с белком программируемой смерти 1 (PD-1) и агонизирует передачу сигналов PD-1, при этом антитело содержит тяжелую цепь, легкую цепь и Fc-область, при этом тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, при этом указанная легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, при этом Fc-область содержит аминокислотную замену, которая приводит к снижению зависимой от антитела клеточной цитотоксичности (ADCC) против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит замену, и при этом антитело имеет тот же или более высокий агонистический эффект на передачу сигналов PD-1 в иммунной клетке по сравнению с исходной молекулой.

[0029] В данном документе в некоторых аспектах раскрыто выделенное антитело, которое специфически связывается с белком программируемой смерти 1 (PD-1), при этом антитело содержит тяжелую цепь, легкую цепь и Fc-область, при этом тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, при этом легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, и при этом антитело усиливает взаимодействие PD-1, экспрессируемого на поверхности иммунной клетки, с PD-L1. В некоторых случаях антитела Fc-область содержит аминокислотную замену, которая приводит к снижению зависимой от антитела клеточной цитотоксичности (ADCC) против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки у субъекта по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит аминокислотную замену, и при этом антитело имеет тот же или более высокий агонистический эффект на передачу сигналов PD-1 в иммунной клетке по сравнению с исходной молекулой.

[0030] В некоторых вариантах осуществления антитела вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 1–3, с 0–3 аминокислотными модификациями. В некоторых вариантах

осуществления антитела переменная область легкой цепи содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 4–6, с 0–3 аминокислотными модификациями. В некоторых вариантах осуществления антитела Fc-область получена из IgG1 и содержит аспарагиновую кислоту (D) в положении 238, пронумерованном в соответствии с нумерацией EU.

[0031] В данном документе в некоторых аспектах раскрыто выделенное антитело, которое специфически связывается с белком программируемой смерти 1 (PD-1), при этом антитело содержит тяжелую цепь, легкую цепь и Fc-область, при этом тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, при этом легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, и при этом (i) переменная область тяжелой цепи содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 1–3, с 0–3 аминокислотными модификациями; (ii) переменная область легкой цепи содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 4–6, с 0–3 аминокислотными модификациями; и (iii) Fc-область получена из IgG1 и содержит аспарагиновую кислоту (D) в положении 238, пронумерованном в соответствии с нумерацией EU.

[0032] В некоторых вариантах осуществления антитела антитело усиливает взаимодействие PD-1, экспрессируемого на поверхности иммунной клетки, с PD-L1.

[0033] В некоторых вариантах осуществления антитела взаимодействие между PD-1 и PD-L1 усиливается, что определено в анализе, описанном в примере 10.

[0034] В некоторых вариантах осуществления антитела антитело индуцирует пониженную зависимость от антитела клеточную цитотоксичность (ADCC) против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки по сравнению с такой же в остальной молекулой, которая содержит Fc-область IgG1, и при этом антитело имеет тот же или более высокий агонистический эффект на передачу сигналов PD-1 в иммунной клетке по сравнению с такой же в остальной молекулой. В некоторых вариантах осуществления антитела ADCC против PD-1, экспрессирующей регуляторную Т-клетку, снижается, что определено с помощью анализа активации натуральных клеток-киллеров, как описано в примере 7. В некоторых вариантах осуществления антитела антитело не приводит к значительной ADCC против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки, что определено с помощью анализа активации натуральных клеток-киллеров, как описано в примере 7.

[0035] В некоторых вариантах осуществления антитела антитело не активирует натуральные клетки-киллеры (NK).

[0036] В некоторых вариантах осуществления антитела переменная область тяжелой цепи содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDRH1), CDRH2 и

CDRH3, и при этом CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1–3, соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями.

[0037] В некоторых вариантах осуществления антитела переменная область легкой цепи содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDRL1), CDRL2 и CDRL3, и при этом CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4–6, соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями.

[0038] В некоторых вариантах осуществления антитела переменная область тяжелой цепи содержит CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и при этом CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1-3 соответственно.

[0039] В некоторых вариантах осуществления антитела переменная область легкой цепи содержит CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и при этом CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4–6, соответственно.

[0040] В некоторых вариантах осуществления антитела переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 7–11.

[0041] В некоторых вариантах осуществления антитела переменная область легкой цепи содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 12–16.

[0042] В некоторых вариантах осуществления антитела тяжелая цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 18.

[0043] В некоторых вариантах осуществления антитела легкая цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 19.

[0044] В некоторых вариантах осуществления антитела Fc-область получена из IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления антитела Fc-область содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 17.

[0045] В некоторых вариантах осуществления антитела переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи образуют структуру, выбранную из группы, состоящей из scFv, sc(Fv)₂, dsFv, Fab, Fab', (Fab')₂ и диатела.

[0046] В некоторых вариантах осуществления антитела антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, функционально связанную с Fc-областью, и при этом легкая цепь содержит переменную область легкой цепи.

[0047] В некоторых вариантах осуществления антитела переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи образуют одноцепочечный переменный фрагмент (ScFv), который функционально связан с Fc-областью.

[0048] В некоторых вариантах осуществления антитела антитело представляет собой гуманизованное антитело.

[0049] В некоторых вариантах осуществления антитела антитело представляет собой человеческое антитело.

[0050] В некоторых вариантах осуществления антитела антитело выбрано из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизованного антитела, химерного антитела и мультиспецифического антитела.

[0051] В некоторых вариантах осуществления антитела антитело является моноклональным.

[0052] В некоторых вариантах осуществления антитела антитело связывает PD-1 человека с KD менее 200 нМ, 100 нМ, 80 нМ, 60 нМ или 40 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С.

[0053] В некоторых вариантах осуществления антитела антитело связывает PD-1 человека с KD менее 60 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С.

[0054] В некоторых вариантах осуществления антитела антитело связывает PD-1 человека с KD менее 40 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С.

[0055] В некоторых вариантах осуществления антитела антитело связывается с PD-1 яванского макака с KD менее 5000 нМ, 4000 нМ, 2000 нМ, 1000 нМ, 800 нМ, 600 нМ, 500 нМ, 400 нМ, 300 нМ или 200 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С.

[0056] В некоторых вариантах осуществления антитела антитело связывается с PD-1 яванского макака с KD менее 600 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С.

[0057] В некоторых вариантах осуществления антитела антитело связывает PD-1 яванского макака с KD менее 300 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С.

[0058] В некоторых вариантах осуществления антитела антитело агонизирует PD-1 человека, экспрессируемый на поверхности иммунной клетки.

[0059] В некоторых вариантах осуществления антитела иммунная клетка представляет собой Т-клетку.

[0060] В некоторых вариантах осуществления антитела связывание антитела с PD-1 человека, экспрессируемым на поверхности иммунной клетки, снижает пролиферацию клетки по сравнению с сопоставимой иммунной клеткой, не связанной с антителом. В некоторых вариантах осуществления антитела клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления антитела снижение активации клеток измеряют с помощью анализа NFAT-репортера, описанного в примере 4. В некоторых вариантах осуществления антитела снижение активации клеток измеряют с помощью анализа активации столбнячным анатоксином или анализа активации вирусным пептидом, описанного в примере 5. В некоторых вариантах осуществления антитела снижение пролиферации клеток измеряют с помощью анализа активации антителом к CD3/28, описанным в примере 6. В некоторых вариантах осуществления антитела снижение пролиферации клеток измеряют, когда иммунная клетка находится в непосредственной близости от клеток, экспрессирующих PD-L1. В некоторых вариантах осуществления антитела снижение пролиферации клеток измеряют с помощью анализа, описанного в примере 8. В некоторых вариантах осуществления антитела снижение пролиферации клеток измеряют *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления антитела снижение пролиферации клеток составляет по меньшей мере около 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% или 50%. В некоторых вариантах осуществления антитела снижение пролиферации клеток составляет от около 10% до 50%, от 10% до 40%, от 10% до 30%, от 10% до 20%, от 10% до 15%, от 20% до 50%, от 20% до 40% или от 20% до 30%.

[0061] В некоторых вариантах осуществления антитела Fc-область селективно связывается с FcγR2B. В некоторых вариантах осуществления антитела антитело связывается с FcγR2B человека с KD менее 5 мкМ, 4 мкМ, 3 мкМ или 2 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °C. В некоторых вариантах осуществления антитела антитело связывается с FcγR2B человека с KD по меньшей мере 2 мкМ, 1 мкМ, 800 нМ, 600 нМ, 500 нМ, 400 нМ, 300 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 80 нМ, 60 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ или 5 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитела антитело связывается с FcγR2B человека с KD от 200 нМ до 5 мкМ, от 400 нМ до 4 мкМ, от 500 нМ до 3,5 мкМ, от 800 нМ до 3 мкМ, от 1 мкМ до 5 мкМ, от 1 мкМ до 4,5 мкМ, от 1 мкМ до 4 мкМ, от 1 мкМ до 3,5 мкМ, от 1 мкМ до 3 мкМ, от 1 мкМ до 2,5 мкМ или от 1 мкМ до 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления антитела антитело связывается с FcγR2A

человека (аллотип 131R) с KD более 5 мкМ или 10 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С. В конкретных вариантах осуществления антитела антитело связывается с FcγR2A человека (аллотип 131R) с KD по меньшей мере 15 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С. В некоторых вариантах осуществления антитела антитело связывается с FcγR2A человека (аллотип 131H) с KD по меньшей мере 50 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С. В некоторых вариантах осуществления антитела антитело связывается с FcγR2A человека (аллотип 131H) с KD по меньшей мере 80 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С. В некоторых вариантах осуществления антитела соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131R) составляет по меньшей мере 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 или 6:1. В некоторых вариантах осуществления антитела соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131R) составляет по меньшей мере 6:1. В некоторых вариантах осуществления антитела соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела к FcγR2A человека (аллотип 131R) составляет около 6:1. В некоторых вариантах осуществления антитела соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела к FcγR2A человека (аллотип 131H) составляет по меньшей мере 10:1, 15:1, 20:1, 40:1 или 50:1. В некоторых вариантах осуществления антитела соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131H) составляет по меньшей мере 40:1. В некоторых вариантах осуществления антитела соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела к FcγR2A человека (аллотип 131H) составляет около 40:1. В некоторых вариантах осуществления антитела соотношение определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С.

[0062] В данном документе в некоторых аспектах раскрыта выделенная нуклеиновая кислота, которая содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептиды, способные образовывать антитело, раскрытое в данном документе.

[0063] В данном документе в некоторых аспектах раскрыт вектор, содержащий одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептиды, способные образовывать антитело, раскрытое в данном документе.

[0064] В данном документе в некоторых аспектах раскрыта клетка-хозяин, содержащая одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих аминокислотную

последовательность тяжелой цепи и легкой цепи, которая при экспрессии способна образовывать антитело, раскрытое в данном документе.

[0065] В данном документе в некоторых аспектах раскрыт способ, включающий культивирование клетки-хозяина, описанной в данном документе, в условиях получения антитела.

[0066] В данном документе в некоторых аспектах раскрыт способ, включающий (a) обеспечение клетки-хозяина, содержащей одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих аминокислотную последовательность тяжелой цепи и легкой цепи, которые при экспрессии способны образовывать антитело, раскрытое в данном документе; (b) культивирование клетки-хозяина, экспрессирующей кодируемую аминокислотную последовательность; и (c) выделение антитела.

[0067] В данном документе в некоторых аспектах раскрыт иммуноконъюгат, содержащий антитело, раскрытое в данном документе, конъюгированное со средством.

[0068] В данном документе в некоторых аспектах раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество антитела, раскрытого в данном документе, или иммуноконъюгата, описанного в данном документе, и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

[0069] В данном документе в некоторых аспектах раскрыта фармацевтическая композиция для применения в лечении заболевания или состояния, содержащая терапевтически эффективное количество антитела, раскрытого в данном документе, или иммуноконъюгата, раскрытого в данном документе, и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

[0070] В данном документе в некоторых аспектах раскрыт набор, содержащий антитело, раскрытое в данном документе, или иммуноконъюгат, раскрытый в данном документе, в контейнере.

[0071] В некоторых случаях набора набор дополнительно содержит информационный материал, содержащий инструкции по применению антитела, раскрытого в данном документе, или иммуноконъюгата, раскрытого в данном документе.

[0072] В данном документе в некоторых аспектах раскрыт способ лечения заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела, раскрытого в данном документе, или иммуноконъюгата, раскрытого в данном документе, или введение субъекту фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе. В некоторых случаях способа заболевание или состояние включает заболевание или состояние, связанное с PD-1. В некоторых случаях заболевание или состояние включает острый рассеянный

энцефаломиелит (ADEM), болезнь Аддисона, аллергию, очаговую алопецию, боковой амиотрофический склероз, ANCA-ассоциированный васкулит, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, астму, атопический дерматит, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунный полиэндокринный синдром, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, церебральную малярию, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, целиакию, болезнь Крона, синдром Кушинга, герпетиформный дерматит, дерматомиозит, сахарный диабет 1 типа, эозинофильный грануломатоз с полиангиитом, заболевание желчного пузыря, болезнь «трансплантат против хозяина», болезнь Грейвса, синдром Гийена – Барре, тиреоидит Хашимото, гнойный гидраденит, связанное с IgG4 заболевание, воспалительное заболевание кишечника (IBD), воспалительный фиброз, синдром раздраженного кишечника, ювенильный артрит, болезнь Kawasaki, лейкоз, волчаночный нефрит, артрит Лайма, лимфому, лимфопролиферативные нарушения, менингоэнцефалит, рассеянный склероз, миастению гравис, миелому, нерадиографический аксиальный спондилоартрит (nr-AxSpA), нейромиелит зрительного нерва, остеоартрит, воспалительные заболевания органов малого таза, пемфигус, перитонит, пилонидальное заболевание, полимиозит, первичный билиарный холангит, первичный склерозирующий холангит, псориаз, псориазический артрит, ревматоидный артрит, саркоидоз, синдром Шегрена, системную красную волчанку, системный склероз, артериит Такаясу, височный артериит, отторжение трансплантата, поперечный миелит, язвенный колит, увеит, васкулит, витилиго и болезнь Вогта – Коянаги – Гарада. В некоторых случаях субъект представляет собой человека.

[0073] В данном документе в некоторых аспектах раскрыт способ понижения регуляции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту антитела, раскрытого в данном документе, введение субъекту иммуноконъюгата, раскрытого в данном документе, или введение субъекту фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе.

[0074] В данном документе в некоторых аспектах раскрыт способ подавления иммунной клетки, экспрессирующей PD-1, включающий приведение иммунной клетки в контакт с антителом, раскрытым в данном документе, или иммуноконъюгатом, раскрытым в данном документе. В некоторых случаях иммунная клетка включает Т-клетку, В-клетку или макрофаг. В некоторых случаях иммунная клетка включает антиген-специфическую Т-клетку. В некоторых случаях субъект представляет собой человека.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0075] Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были специально и индивидуально указаны как включенные посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0076] Новые признаки настоящего изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Более полное понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет получено путем ссылки на следующее подробное описание, в котором изложены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы настоящего изобретения, а также на прилагаемые графические материалы.

[0077] **Фигура 1А** включает схему (слева), которая показывает аАРС (искусственную антигенпрезентирующую клетку), экспрессирующую FcR, и противоположную клеточную мембрану, которая представляет PD-1 и TCR (Т-клеточный рецептор), и график (справа), который демонстрирует в присутствии FcR-экспрессирующей аАРС обработку типичным клоном 19 mIgG1 антитела, приводящим к ингибированию Т-клеток, как указано снижением сигналов люциферазы, при этом обработка изотипическим контролем mIgG1 не оказывает существенного влияния на активацию Т-клеток. В этом эксперименте клетки Jurkat, содержащие NFAT-люциферазный репортер, совместно культивировали со стимуляторными клетками, которые экспрессировали FcγR2В мыши с увеличением концентрации клона 19 mIgG1 антитела к PD-1 или изотипического контроля, а люминесценцию измеряли как считывание активации Т-клеток.

[0078] **Фигура 1В** включает схему аАРС (искусственной антигенпрезентирующей клетки), не экспрессирующей FcR, и противоположной клеточной мембраны, которая представляет PD-1 и TCR (рецептор Т-клеток; слева), и график (справа), который показывает, что в присутствии аАРС, не экспрессирующей FcR, обработка иллюстративным клоном 19 mIgG1 антитела не оказывала влияния на активацию Т-клеток, как показано в равновесном количестве в сигнале люциферазы, аналогично эффекту после обработки изотипическим контролем mIgG1. В этом эксперименте один и тот же анализ в качестве эксперимента, показанного на **фигуре 1А** проводили с использованием стимуляторных клеток, которые не экспрессируют какой-либо Fc-рецептор.

[0079] На **фигуре 2А** показан график, который демонстрирует влияние иллюстративных антител на активацию Т-клеток, что определено с помощью сигналов NFAT в анализе репортера Jurkat. На фигуре показано, что обработка клеток всеми антителами к PD-1 и мутантными по P238D версиями humCL19v1 (см. таблицу 2), но не изотипическим

контролем, значительно подавляла активацию Т-клеток; не было обнаружено существенной разницы между версией IgG1 дикого типа антитела humCL19v1 и мутантной по P238D версией антитела humCL19v. В этом эксперименте экспрессирующие PD-1 содержащие репортер клетки Jurkat, совместно культивировали в течение 6 часов с экспрессирующими FcγR2B человека стимуляторными клетками в присутствии различных антител к PD-1 при одной концентрации 10 мкг/мл, затем активность NFAT измеряли с помощью количественного определения люминесценции.

[0080] На **фигуре 2В** показан график, демонстрирующий влияние иллюстративных антител на активацию Т-клеток, что определено с помощью сигналов NFAT в другом анализе содержащих репортер Т-клеток, в котором стимуляторные клетки HEK293Т человека, экспрессирующие антитело к CD3, «Т-клеточный стимулятор», использовали для стимуляции активации Т-клеток Jurkat. На графике показано, что обработка клеток мутантной по P238D версии humCL19v1, но не изотипическим контролем P238D, значительно подавляла активацию Т-клеток.

[0081] На **фигуре 3А** показан график, который демонстрирует влияние иллюстративных антител на активацию Т-клеток, что определено с помощью высвобождения IFN γ в анализе активации столбнячным анатоксином (ТТ). Высвобождение IFN γ мононуклеарными клетками периферической крови после анализа активации столбнячным анатоксином в присутствии блокирующих антител к PD-L1/2, было значительно подавлено после обработки антителами к PD-1 и мутантным по P238D версиям по сравнению с обработкой изотипическим контролем IgG1. В этом эксперименте PBMC человека от 6 здоровых доноров стимулировали столбнячным анатоксином в присутствии различных антител к PD-1 в одной дозе 1 мкг/мл. Продуцирование IFN γ оценивали через 96 часов с помощью ELISA супернатантов и данные каждого донора нормализовали по уровню IFN γ в клетках, стимулированных в отсутствие тестируемого антитела. *p < 0,05 при сравнении с изотипическим контролем с использованием однофакторного ANOVA.

[0082] На **фигуре 3В** показан график, который демонстрирует влияние иллюстративных антител на активацию Т-клеток, что определено по продуцированию IFN γ в анализе активации вирусным пептидом. Продуцирование IFN γ мононуклеарными клетками периферической крови после стимуляции пептидами CEF HLA класса I в присутствии Brefeldin A была значительно подавлена после обработки мутантными по P238D humCL19v1 по сравнению с обработкой изотипическим контролем IgG1.

[0083] На **фигуре 4** показан график, демонстрирующий влияние иллюстративных антител на экспрессию CD25 после индукции CD25 с помощью стимуляции антителом к CD3 и антителом к CD28 мононуклеарных клеток периферической крови. В отличие от

изотипического контроля мутантное по P238D антитело humCL19v1, подобно антителам IgG1, эффективно подавляло экспрессию (CD25) первичных активированных Т-клеток. В этом эксперименте РВМС человека от 3 здоровых доноров стимулировали растворимыми антителами к CD3 и антителами к CD28 в присутствии различных антител к PD-1 в одной дозе 1 мкг/мл. Экспрессию CD25 на CD4 Т-клетках оценивали через 72 часа с помощью проточной цитометрии и данные каждого донора нормализовали по уровню экспрессии CD25 в клетках, стимулированных в отсутствие тестируемого антитела. * $p < 0,05$ при сравнении с изотипическим контролем с использованием однофакторного ANOVA.

[0084] На **фигуре 5** показана *in vitro* дегрануляция натуральных клеток-киллеров (зависимая от антитела клеточная цитотоксичность или ADCC), индуцированная путем совместного культивирования с регуляторными Т-клетками в соотношении 1:5 очищенных НК-клеток с регуляторными Т-клетками в присутствии антитела к PD-1. В отличие от изотипического контроля IgG1 все антитела к PD-1 изотипа IgG1, но не мутантные по P238D антитела к PD-1 (humCL19v1 P238D), привели к значительному уничтожению за счет ADCC регуляторных Т-клеток с дегрануляцией тем самым клеток. В этом эксперименте 20000 НК-клеток здоровых доноров инкубировали с регуляторными Т-клетками с указанными антителами при 1 мкг/мл. Показаны данные двух отдельных исследований с одним донором Treg и 3 разными донорами НК-клеток на исследование. Каждый отличающийся символ представляет отдельного донора НК-клеток с дегрануляцией НК-клеток, нормализованной по отношению к отсутствию антител для этого донора. * $p < 0,05$ при сравнении с изотипическим контролем с использованием однофакторного ANOVA.

[0085] На **фигуре 6** показано только увлажненное антитело к PD-1 humCLV19v1 P238D способно ингибировать активацию Т-клеток в присутствии высокого содержания PD-L1, тогда как все другие агонистические антитела к PD-1 не способны, что определено с помощью сигналов NFAT в анализе репортера Jurkat. Когда экспрессирующие PD-L1 клетки, содержащие конструкцию стимулятора Т-клеток, инкубировали с экспрессирующим PD-1 содержащими репортер клетками Jurkat, чтобы тестировать влияние мутантного по P238D humCL19v1 по сравнению с другими антителами к PD-1, только мутантное по P238D антитело к PD-1 значительно подавляло активацию Т-клеток. В этом эксперименте экспрессирующие PD-1 содержащие репортер клетки Jurkat культивировали совместно с экспрессирующими PD-L1 стимуляторными клетками в присутствии различных антител к PD-1 и оценивали активацию Т-клеток по продуцированию люциферазы.

[0086] На **фигурах 7А–7Е** представлен графики, демонстрирующий влияние типичных агонистических антител к PD-1 на активацию Т-клеток в RA PBMC, совместных культур с фибробластами, как измерено по экспрессии CD25 (**фигура 7А**), экспрессии ICOS (**фигура 7В**), IFN γ (**фигура 7С**, «IFN γ » на фигуре), IL-17F (**фигура 7D**) и TNF α (**фигура 7Е**, «TNF α » на фигуре), соответственно. В этом эксперименте PBMC пациентов с RA совместно культивировали с фибробластами, подобными синовиоцитам, и стимулировали антителом к CD3 и антителом к CD28 в присутствии различных антител к PD-1 или изотипического контроля. Клетки и супернатанты оценивали в течение 72 часов. Экспрессию CD25 и ICOS на CD4 Т-клетках оценивали с помощью проточной цитометрии. Уровни IFN γ , IL-17F и TNF α в супернатантах культур оценивали с помощью цитометрического анализа на гранулах. Каждый символ представляет данные отдельного донора PBMC, нормализованные по отношению к отсутствию антител для этого донора. * $p < 0,05$ при сравнении с изотипическим контролем с использованием однофакторного ANOVA.

[0087] На **фигуре 8** представлен график, демонстрирующий влияние иллюстративных агонистических антител к PD-1 на связывание PDL1-Fc с экспрессирующими PD-1 клетками Jurkat, предварительно инкубированными с различными антителами к PD-1. Было показано, что только humCL19v1 P238D усиливает связывание PDL1-Fc с экспрессирующими PD-1 клетками Jurkat. В этом эксперименте экспрессирующие PD-1 клетки Jurkat предварительно инкубировали в течение одного часа на льду с 10 мкг/мл, затем окрашивали с повышающимися концентрациями конъюгированного AF647 PDL1-Fc.

[0088] На **фигурах 9А–9D** показано, что гены, подавленные агонистом PD-1, связаны с аутоиммунитетом. На **фигуре 9А** представлен график, демонстрирующий активацию Т-клеток Jurkat в отсутствие PD-L1, как измерено по активности люциферазы, но в присутствии иллюстративных агонистических антител к PD-1 (клон 19 mIgG1) или изотипического контроля. Экспрессирующие PD-1 репортерные клетки Jurkat культивировали совместно с экспрессирующими FcR стимуляторными клетками в присутствии 5 мкг/мл клона 19 mIgG1 или изотипического контроля и брали порцию клеток из каждой лунки для оценки продуцирования люциферазы в качестве показателя активации Т-клеток. На **фигуре 9В** показаны репрезентативные графики проточной цитометрии активированных клеток Jurkat до и после отбора с помощью магнитных гранул. Клетки Jurkat отделяли от стимуляторных клеток путем отрицательного отбора с использованием магнитных гранул, а чистоту очищенных Jurkat оценивали с помощью проточной цитометрии. На **фигуре 9С** представлен вулканный график, на котором показаны дифференциально экспрессируемые гены для Jurkat, активированных в присутствии агониста PD-1 против изотипического контроля, посредством секвенирования общей РНК

очищенных клеток Jurkat с помощью GeneWis. На **фигуре 9D** показано, что сигнатура генов значительно снижается с помощью агонизма PD-1. Гены картировали по каталогу EBI GWAS для идентификации обогащения генов, связанных с различными признаками.

[0089] На **фигурах 10A–10D** представлены графики, демонстрирующие влияние иллюстративного агонистического антитела к PD-1 клона 19 на мышинной модели SLE, как измерено по общему уровню IgG к гистону (**фигура 10A**), уровню IgG к dsDNA (**фигура 10B**) в сыворотке в день 35 после переноса клеток, частоте Tfh-клеток (CXCR5+ICOS+ в процентах от общего количества CD4) в селезенке в день 35 (**фигура 10C**) и массе селезенки на момент прекращения исследования в день 35 (**фигура 10D**). Уровень IgG к dsDNA оценивали с помощью ELISA и количественно определяли в виде произвольных единиц с использованием стандартной кривой объединенной сыворотки.

[0090] На **фигурах 11A–11B** показано, что иллюстративное агонистическое антитело к PD-1 клон 19 предотвращает размножение Tfh-клеток, а не истощение Tfh-клеток на мышинной модели SLE. На **фигуре 11A** показана частота Tfh-клеток в селезенке в день 30, и **фигура 11B** демонстрирует массу селезенки в день 30 после введения дозы клона 19 в день 0, день 14 или день 28 после переноса иммунных клеток.

[0091] На **фигурах 12A–12B** показано, что иллюстративное агонистическое антитело к PD-1 клон 19 ингибирует реакцию гиперчувствительности замедленного типа у мышей. На **фигуре 12A** показаны эффекты клона 19 на индуцированную гемоцианином лимфы улитки (KLH) гиперчувствительность замедленного типа (DTH). Мышей иммунизировали с помощью антигена KLH в день 0 через час после обработки 10 мг/кг клона 19 или антитела изотипического контроля, а затем подвергали интрадермальному стимулированию на одном ухе в день 5. Разница в массе биоптата между стимулированным и нестимулированным ухом в разных группах обработки измерялась в день 6 и показана на **фигуре**. На **фигуре 12B** показаны результаты другого эксперимента, в котором мышей обрабатывали аналогичным образом, но с разными дозами клона 19. Каждый символ представляет отдельную мышь. Символ * выше групп представляет собой $p < 0,05$ по сравнению с изотипическим контролем с использованием критерия Краскала – Уоллиса и критерия множественных сравнений Даннетта.

[0092] На **фигурах 13A–13E** показано что иллюстративное агонистическое антитело к PD-1 humCL19v1 P238D облегчает симптомы болезни «трансплантат против хозяина» на мышинной модели. Облученным мышам инъецировали моноклеарные клетки периферической крови человека (PBMC), а затем их лечили с помощью 10 мг/кг humCL19v1 P238D или мутантного по P238D изотипа hIgG1 в день 0 и в дни 7, 14 и 21 после инъекции PBMC. Было показано, что humCL19v1 P238D значительно снижает массу

селезенки (**фигура 13А**), размножение иммунных клеток человека в селезенке (**фигура 13В**) и печени (**фигура 13С**) и уровни воспалительных цитокинов в сыворотке (**фигура 13D**) по сравнению с изотипическим контролем. На **фигуре 13Е** показано, что humCL19v1 P238D также снижает продуцирование цитокинов CD4 и CD8 на основе клеток, что оценивается с помощью внутриклеточной проточной цитометрии иммунных клеток человека в печени и селезенке.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0093] В некоторых аспектах в данном документе раскрыто антитело, которое специфически связывается с белком программируемой смерти 1 (PD-1) и агонизирует передачу сигналов PD-1. В некоторых случаях антитело к PD-1, раскрытое в данном документе, может действовать как агонист PD-1, тем самым модулируя иммунные ответы, регулируемые PD-1.

[0094] В некоторых случаях агонистическое антитело к PD-1, раскрытое в данном документе, содержит Fc-область, которая имеет аминокислотную замену, которая приводит к снижению зависимой от антитела клеточной цитотоксичности (ADCC) против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки у субъекта по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит аминокислотную замену Fc-области, но поддерживает или усиливает агонистический эффект антитела на передачу сигналов PD-1 по сравнению с исходной молекулой. В некоторых случаях аминокислотная замена Fc-области антитела к PD-1, раскрытого в данном документе, приводит к повышению селективности связывания с Fc γ R2B, *например*, с относительно более высокой аффинностью связывания с Fc γ R2B по сравнению с другими типами Fc-рецепторов, и разница в аффинности связывания выше, чем родительская молекула, в которой отсутствует аминокислотная замена. Термины «Fc γ R2B», «Fc γ R2B», «Fc γ gammaR2B» и «Fc γ RIIB» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к одному и тому же подтипу Fc-рецептора.

[0095] Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, аминокислотная замена Fc-области антитела к PD-1, раскрытого в данном документе, может усиливать селективность связывания антитела с Fc γ R2B. У людей имеется один ингибиторный Fc-гамма-рецептор (Fc γ R2B), тогда как все другие Fc-гамма-рецепторы обеспечивают активирующие иммунитет сигналы (*например*, Fc γ R1, Fc γ R2A, Fc γ R3A и Fc γ R3B). Эти активирующие FcR могут способствовать зависимой от антитела клеточной цитотоксичности (ADCC) и зависимому от антитела клеточному фагоцитозу (ADCP), что может привести к истощению клеток, экспрессирующих мишень. Считается, что повышение селективности связывания Fc с Fc γ R2B может повысить эффективность агонистических антител к PD-1, раскрытых в

данном документе, при подавлении иммунных ответов без индуцирования воспалительной передачи сигналов FcR и без истощения регуляторных Т-клеток, экспрессирующих PD-1. Более того, в некоторых случаях селективное связывание с Fc γ R2B может способствовать двусторонней ингибирующей передаче сигналов через PD-1 на экспрессирующей PD-1 клетке и через Fc γ R2B на экспрессирующей Fc γ R2B клетке, что будет способствовать иммуносупрессивному действию антитела. И наоборот, в некоторых случаях очень высокая аффинность в отношении Fc γ R2B может отрицательно влиять на период полужизни антител из-за оборота рецептора в синусоидальных эпителиальных клетках печени (Ganesan et al. J Immunol. 2012 Nov 15;189(10):4981–8. doi: 10.4049/jimmunol.1202017), что продемонстрировано на имеющем усиленное связывание с Fc γ R2B антителе IgG1 XmAb7195, что связывается с Fc γ R2B с K_D 7,74 нМ (Chu et al. J Allergy Clin Immunol. 2012 Apr;129(4):1102–15. doi: 10.1016/j.jaci.2011.11.029.) и, по сообщению Xencor, имеет средний период полужизни *in vivo* 3,9 дня в испытании фазы 1a (American Thoracic Society (ATS) 2016 International Conference in San Francisco, CA – A6476: Poster Board Number 407), по сравнению со средним периодом полужизни около 21 дня для IgG1 дикого типа (Morell et al. J Clin Invest. 1970;49(4):673–680. doi: 10.1172/JCI106279). Таким образом, хотя селективность для Fc γ R2B и достаточное связывание для обеспечения агонизма могут быть желательными для агонистического антитела к PD-1, чрезмерно высокая аффинность в отношении Fc γ R2B может быть нежелательной в терапевтическом контексте, поскольку возникающий в результате укороченный период полужизни будет требовать более частого введения доз. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, аминокислотная замена Fc-области антитела к PD-1, раскрытого в данном документе, может повысить селективность связывания антитела с Fc γ R2B, при этом избегая чрезмерно высокой аффинности в отношении Fc γ R2B и сохранение желаемого периода полужизни антитела.

[0096] В некоторых случаях описанные агонистические антитела к PD-1 являются более эффективными, чем существующие антитела при обеспечении ингибирующей передачи сигналов к иммунным клеткам и/или иммунной системе, что подавляет ответы иммунных клеток. В некоторых случаях антитела к PD-1, раскрытые в данном документе, повышают связывание PD-1 с PD-L1. В некоторых случаях антитела к PD-1, раскрытые в данном документе, способствуют передаче сигналов PD-1 в иммунной клетке даже в непосредственной близости к PD-L1. Антитела к PD-1, раскрытые в данном документе, могут быть особенно полезны при лечении опосредованных иммунной системой и/или связанных с PD-1 нарушений или заболеваний, вызванных aberrантными иммунными патологиями или имеющих раковое происхождение. Связанные с PD-1 нарушения могут включать нарушения, которые проявляются в виде дисрегулируемой экспрессии PD-1

и/или активности в одном или нескольких типах иммунных клеток в качестве одного из симптомов или вызваны дисрегуляцией экспрессии PD-1 и/или активности в одном или нескольких типах иммунных клеток.

[0097] В некоторых аспектах в данном документе описаны способы, системы, фармацевтические композиции, композиции, способ лечения, наборы и способы изготовления, которые относятся к антителам PD-1.

[0098] Следует понимать, что одна, несколько или все характерные особенности различных вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, можно применить к любому аспекту, если только иное четко не следует из содержания. Кроме того, различные варианты осуществления можно комбинировать с образованием других вариантов осуществления настоящего изобретения. Эти и другие аспекты изобретения станут очевидными для специалиста в данной области техники. Эти и другие варианты осуществления изобретения дополнительно представлены в подробном описании ниже.

Определения

[0099] Термины «агонист», «агонистический», «агонизировать» и другие грамматические эквиваленты, используемые в данном документе, относятся или относятся к средству, которое может связываться с рецептором или любым другим белком-мишенью и активировать, или усиливать активность, или способствовать инициации активации рецептора или белка-мишени. В некоторых случаях агонист может стимулировать рецептор или другой белок-мишень, который он связывает, может индуцировать биологический ответ, *например*, сигнальную трансдукцию или другие изменения в активностях клеток. Как используется в данном документе агонистическое антитело к PD-1 (или фрагмент антитела) относится к антителу (или фрагменту антитела), которое связывается с PD-1, экспрессируемым на поверхности иммунной клетки, и усиливает его ингибирующий сигнал на иммунную клетку, включая без ограничений Т-клетки, макрофаги и/или В-клетки.

[0100] В настоящем изобретении везде, где аспекты описаны с использованием формулировки «содержащий», также предусмотрены иные аналогичные аспекты, описанные с использованием терминов «состоящий из» и/или «состоящий по существу из». Все определения, приведенные в данном документе, независимо от того, упомянуты они специально или нет, должны рассматриваться как относящиеся к определениям, используемым в описании и прилагаемой формуле изобретения.

[0101] В настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа предусматривают множественное число, если иное четко не следует из контекста. Например, термин «клетка» подразумевает одну или более клеток, включая их смеси.

[0102] В настоящем изобретении одно, некоторые или все свойства различных вариантов осуществления, описанных в данном документе, могут быть применены к любому аспекту, если содержание явно не диктует иное. Кроме того, различные варианты осуществления можно комбинировать с образованием других вариантов осуществления настоящего изобретения. Эти и другие аспекты изобретения станут очевидными для специалиста в данной области техники. Эти и другие варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно представлены в подробном описании в данном документе.

[0103] Во всему описанию и прилагаемой формуле изобретения, если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, в Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press для специалистов представлен общий словарь многих терминов, используемых в настоящем документе.

[0104] Аминокислоты в настоящем документе могут быть обозначены либо их общепринятыми трехбуквенными символами, либо с помощью однобуквенных символов, рекомендованных Комиссией по биохимической номенклатуре ИЮПАК-ИЮБ. Нуклеотиды также могут обозначаться своими общепринятыми однобуквенными кодами.

[0105] Нумерация аминокислот в переменном домене, CDR и каркасных областях (FR) антитела соответствует, если не указано иное, определению по Kabat, представленному в Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991).

[0106] Термин «около» или «приблизительно» означает в пределах приемлемого диапазона погрешности для конкретного значения, что определено специалистом в данной области техники, что частично зависит от способа измерения или определения значения, *т. е.* от ограничений измерительной системы. Например, «около» может означать в пределах 1 или более 1 стандартного отклонения при практическом применении в данной области техники. В качестве альтернативы, «около» может означать диапазон в пределах до 20%, до 10%, до 5% или до 1% от данного значения. В качестве альтернативы, особенно в отношении биологических систем или процессов, термин может означать в пределах порядка величины, *например*, в пределах 5-кратного или в пределах 2-кратного значения. Если конкретные значения описаны в настоящей заявке и формуле изобретения, если не указано иное, следует считать, что термин «около» означает в пределах приемлемого диапазона погрешности для конкретного значения.

[0107] Термины «полипептид», «олигопептид», «пептид» и «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и он может прерываться отличными от аминокислот соединениями. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным путем или путем вмешательства; например, образование дисульфидной связи, гликозилирование, липидирование, ацетилирование, фосфорилирование или любые другие манипуляции или модификации, такие как конъюгация с метящим компонентом. Также в определение включены, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислоты (включая, например, неприродные аминокислоты и т. д.), а также другие модификации, известные в уровне техники. Следует понимать, что поскольку полипептиды, описанные в данном документе, основаны на антителе, полипептиды могут встречаться в виде отдельных цепей или связанных цепей.

[0108] Термин «аминокислота» относится к природным, неприродным и синтетическим аминокислотам, включая без ограничений оптические изомеры D или L, а также аналоги аминокислот и пептидомиметики. Для обозначения аминокислот используют стандартные одно- или три буквенные коды.

[0109] «Вариант» при применении к белку представляет собой белок с гомологией последовательности с нативным биологически активным белком, который сохраняет по меньшей мере часть терапевтической и/или биологической активности биологически активного белка. Например, вариантный белок может иметь по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности аминокислотной последовательности по сравнению с эталонным биологически активным белком или любым диапазоном т по меньшей мере 70% до 99%. Используемый в данном документе термин «биологически активный белковый фрагмент» включает белки, модифицированные намеренно, например, путем сайт-направленного мутагенеза, синтеза кодирующего гена, вставок или случайных мутаций.

[0110] В контексте полипептидов «линейная последовательность» или «последовательность» представляет собой порядок аминокислот в полипептиде в направлении от амино-конца к карбоксильному концу, в котором остатки, соседние друг по отношению к другу в последовательности, являются смежными в первичной структуре полипептида. «Частичная последовательность» представляет собой линейную последовательность части полипептида, которая, как известно, содержит дополнительные остатки в одном или обоих направлениях.

[0111] «Полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота», используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к полимерам нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть включена в полимер ДНК или РНК–полимеразой. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Если имеется, модификация нуклеотидной структуры может быть обеспечена до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, например, путем конъюгации с метящим компонентом. Другие типы модификаций включают, например, «кэпы», замену одного или более встречающихся в природе нуклеотидов аналогом, межнуклеотидные модификации, такие как, например, с незаряженными связями (*например*, метилфосфонаты, фосфотриэфиры, фосфоамидаты, карбаматы и т. д.) и с заряженными связями (*например*, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и т. д.), содержащие боковые фрагменты, такие как, например, белки (*например*, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, *ply*-L-лизин и т. д.), содержащие интеркаляторы (*например*, акридин, псорален и т. д.), содержащие хелататоры (*например*, металлы, радиоактивные металлы, бор, окислительные металлы и т. д.), содержащие алкилаторы, содержащие модифицированные связи (*например*, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т. д.), а также немодифицированные формы полинуклеотида(ов). Кроме того, любая из гидроксильных групп, обычно присутствующих в сахарах, может быть заменена, например, фосфонатными группами, фосфатными группами, защищенными стандартными защитными группами или активированными для получения дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами или может быть конъюгирована с твердыми подложками. 5'- и 3'-концевой ОН могут быть фосфорилированы или замещены аминами или фрагментами органических кэпирующих групп от 1 до 20 атомов углерода. Другие гидроксилы также могут быть дериватизированы в стандартные защитные группы. Полинуклеотиды также могут содержать аналогичные формы сахаров рибозы или дезоксирибозы, которые обычно известны в уровне техники, включая, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидо-рибозу, аналоги карбоциклического сахара, α -аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, пиранозные сахара, фуранозные сахара, седогептулозы, ациклические аналоги и нуклеозидные аналоги с удаленными азотистыми основаниями, такие как метилрибозид. Одна или более фосфодиэфирных связей могут быть заменены альтернативными связывающими группами. Эти альтернативные связывающие

группы включают без ограничения варианты осуществления, в которых фосфат заменен на P(O)S («тиоат»), p(S)S («дитиоат»), (O)NR₂ («амидат»), P(O)R, P(O)OR', CO или CH₂ («формацеталь»), в котором каждый R или R' независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил (1–20 C), необязательно содержащий эфирную (-O-) связь, арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил. Не все связи в полинуклеотиде должны быть идентичными. Предыдущее описание относится ко всем полинуклеотидам, упомянутым в данном документе, включая РНК и ДНК.

[0112] «Вариабельная область» антитела относится к вариабельной области легкой цепи антитела или вариабельной области тяжелой цепи антитела, отдельно или в комбинации. Каждая из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей состоит из четырех каркасных областей (FR), связанных тремя определяющими комплементарность областями (CDR), также известными как гипервариабельные области. CDR в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости к FR и с CDR из другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител. Существует по меньшей мере две методики определения CDR: (1) подход на основе межвидовой вариабельности последовательностей (*m. e.* Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); и (2) подход на основе кристаллографических исследований комплексов антиген–антитело (Al-lazikani et al (1997) J. Molec. Biol. 273:927–948)). Как используется в данном документе, CDR может относиться к CDR, определенным любым подходом или комбинацией обоих подходов.

[0113] «Константная область» антитела относится к константной области легкой цепи антитела или константной области тяжелой цепи антитела, отдельно или в комбинации.

[0114] «Клетка-хозяин» включает отдельную клетку или клеточную культуру, которая может представлять собой или быть реципиентом для вектора(ов), содержащих экзогенные полинуклеотиды. Клетки-хозяева включают потомство одной клетки-хозяина, и потомство необязательно может быть полностью идентичным (по морфологии или по комплементарности геномной ДНК) исходной родительской клетке из-за естественной, случайной или преднамеренной мутации. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные *in vivo* полинуклеотидом(ами) по настоящему изобретению.

[0115] Термин «Fc-область» используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина. «Fc-область» может представлять собой Fc-область нативной последовательности или вариантную Fc-область. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно определяется отрезком от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до его карбоксильного конца. Нумерация остатков в Fc-области соответствует нумерации EU,

как по Кабату. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. Fc-область иммуноглобулина обычно содержит два константных домена, CH2 и CH3.

[0116] «Область Fc с нативной последовательностью» включает аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности области Fc, встречающейся в природе. «Вариантная Fc-область» содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности Fc-области нативной последовательности по меньшей мере одной аминокислотной модификацией, но при этом сохраняет по меньшей мере одну эффекторную функцию Fc-области нативной последовательности. В некоторых случаях вариантная Fc-область имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с Fc-областью нативной последовательности или с Fc-областью исходного полипептида, *например*, от около одной до около десяти аминокислотных замен, *например*, от около одной до около пяти аминокислотных замен, в Fc-области нативной последовательности или в Fc-области исходного полипептида. В некоторых случаях вариантная Fc-область в данном документе обладает по меньшей мере около 80% идентичностью последовательности с Fc-областью нативной последовательности и/или с Fc-областью исходного полипептида. В некоторых случаях вариантная Fc-область в данном документе обладает по меньшей мере около 90% идентичностью последовательности с Fc-областью нативной последовательности и/или с Fc-областью исходного полипептида. В некоторых случаях вариантная Fc-область в данном документе обладает по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% идентичностью последовательности и идентичностью последовательности между указанными диапазонами с Fc-областью нативной последовательности и/или Fc-областью исходного полипептида.

[0117] «Индивидуум» или «субъект» представляет собой млекопитающее, *например*, человека. Млекопитающие также включают без ограничения сельскохозяйственных животных, спортивных животных, домашних животных, приматов, лошадей, собак, кошек, мышей и крыс.

[0118] Используемый в данном документе термин «вектор» означает конструкцию, способную доставлять и экспрессировать один(одну) или более генов или последовательностей, представляющих интерес, в клетку-хозяина. Примеры векторов включают без ограничения вирусные векторы, векторы экспрессии на основе голой ДНК или РНК, плазмидные, космидные или фаговые векторы, ДНК- или РНК-векторы экспрессии, связанные с катионными конденсирующими средствами, ДНК- или РНК-

векторы экспрессии, инкапсулированные в липосомы, и некоторые эукариотические клетки, такие как продуцирующие клетки.

[0119] Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству средства, которое является достаточным для достижения полезных или желаемых результатов. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от одного или более из субъекта и состояния болезни, подлежащего лечению, массы и возраста субъекта, тяжести состояния болезни, способа введения и т. п., что может быть легко определено специалистом в данной области техники. Термин «эффективное количество» также относится к дозе, которая обеспечит изображение для выявления с помощью соответствующего способа визуализации. Конкретная доза может варьироваться в зависимости от одного или более из выбранного конкретного средства, режима введения доз, которому необходимо следовать, от того, вводится ли оно в комбинации с другими соединениями, времени введения, ткани, подлежащей визуализации, и физической системы доставки в который оно переносится. Эффективное количество активного средства можно вводить в однократной дозе или в нескольких дозах. Терапевтически эффективное количество антитела находится в диапазоне от около 0,001 до около 25 мг/кг массы тела, *например*, от около 0,01 до около 25 мг/кг массы тела, от около 0,1 до около 20 мг/кг массы тела или от около 1 до около 10 мг/кг. Дозировка может быть скорректирована, при необходимости, в соответствии с наблюдаемыми эффектами лечения и/или в качестве наиболее эффективной для обеспечения лечения, предупреждения, контроля симптомов и т. п., что определено в специалистом в данной области. Соответствующая доза выбрана на основании клинических показаний лечащим врачом или специалистом в данной области. Компонент может быть описан в данном документе как имеющий по меньшей мере эффективное количество или по меньшей мере количество, эффективное для получения желаемого результата, например, связанного с конкретными назначением или целью, такими как любая описанная в данном документе. Желаемый терапевтический результат, описанный в данном документе, может включать без ограничения лечение, облегчение или устранение нарушения, рака, заболевания, связанного с иммунитетом, нарушения, связанного с PD-1, и/или любых симптомов из связанных с иммунитетом патологий и т. п., как описано в данном описании или прилагаемой формуле изобретения.

[0120] Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» или «фармацевтически приемлемое вспомогательное средство» включает любой материал, который при объединении с активным ингредиентом позволяет ингредиенту сохранять биологическую активность и не реагировать с иммунной системой субъекта. Примеры включают без ограничения любой из стандартных фармацевтических носителей,

таких как забуференный фосфатом солевой раствор, вода, эмульсии, такие как эмульсия масло/вода, и различные типы смачивающих средств. Иллюстративные разбавители для аэрозоля или парентерального введения представляют собой забуференный фосфатом солевой раствор или нормальный (0,9%) солевой раствор. В некоторых случаях композиции, содержащие такие носители, составляют хорошо известными традиционными способами (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; и Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000).

[0121] В описании и прилагаемой формуле изобретения способы и системы по настоящему изобретению, как описано в данном документе, могут использоваться, если не указано иное, традиционные методики и описания молекулярной биологии (включая рекомбинантные методики), биологии клеток, биохимии, микроматричной и технологии секвенирования, которые известны специалистам в данной области техники. Такие традиционные методики включают синтез полимерных матриц, гибридизацию и лигирование олигонуклеотидов, секвенирование олигонуклеотидов и выявление гибридизации с использованием метки. Конкретные иллюстрации подходящих методик могут быть включены в примеры в данном документе. Однако, конечно же, можно использовать эквивалентные традиционные процедуры. Такие традиционные методики и описания можно найти в стандартных лабораторных руководствах, таких как Green, et al., Eds., *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series* (Vols. I–IV) (1999); Weiner, et al., Eds., *Genetic Variation: A Laboratory Manual* (2007); Dieffenbach, Dveksler, Eds., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (2003); Bowtell and Sambrook, *DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual* (2003); Mount, *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis* (2004); Sambrook and Russell, *Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2006); и Sambrook and Green, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th Edition (2012) (все из Cold Spring Harbor Laboratory Press); Stryer, L., *Biochemistry* (4th Ed.) W.H. Freeman, N.Y. (1995); Gait, “*Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*” IRL Press, London (1984); Nelson and Cox, *Lehninger, Principles of Biochemistry*, 6th Ed., W.H. Freeman Pub., New York (2012); R.I. Freshney, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6th Ed., Wiley–Blackwell (2010); и Berg et al., *Biochemistry*, 5th Ed., W.H. Freeman Pub., New York (2002), все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей. Перед обращением к описанию композиций, исследовательских инструментов, систем и способов по настоящему изобретению следует понимать, что настоящее описание не ограничено конкретными системами и способами, композициями, мишенями и применениями, поскольку они могут, конечно, меняться. Следует также понимать, что терминология,

применяемая в данном документе, предназначена исключительно для описания конкретных аспектов и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[0122] Термин «антитело к PD-1» или молекула, используемые в данном документе, если не указано иное, относятся либо к антителу, либо к его связывающему фрагменту, который способен специфически связываться с PD-1.

[0123] В настоящем описании термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, способной специфически связываться с мишенью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и т. д., через по меньшей мере один сайт распознавания антигена, расположенный в вариабельной области молекулы иммуноглобулина. Этот используемый в данном документе термин относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном и содержит сайт связывания с FcR, который может быть или может не быть функциональным. Этот используемый в настоящем изобретении термин охватывает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, диатела) Fv-фрагменты и одноцепочечные (ScFv) мутанты, которые содержат сайт распознавания антигена или антигенсвязывающий сайт и обладают способностью связываться с антигеном. Антигенсвязывающие фрагменты антитела или иммуноглобулина хорошо известны в уровне техники. Такой фрагмент может иметь функциональный или нефункциональный сайт связывания Fc-рецептора. Кроме того, этот используемый в данном документе термин не ограничивается только интактными поликлональными или моноклональными антителами, мультиспецифическими антителами, такими как биспецифические или полиспецифические антитела, полученные из по меньшей мере двух интактных антител, химерными антителами, гуманизированными антителами, одноцепочечными, химерными, синтетическими, рекомбинантными, гибридными, мутантными, привитыми антителами, антителами человека и любой другой модифицированной молекулой иммуноглобулина, содержащей антигенсвязывающий сайт, при условии, что антитела проявляют желаемую биологическую активность.

[0124] Существуют пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них могут дополнительно подразделяться на подклассы (подтипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, обозначены как альфа, дельта, эpsilon, гамма и мю, соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. Если ограничения контекста не предполагают иного, антитела по настоящему изобретению могут принадлежать к одному

из этих классов или подклассов антител. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам антител, как правило, обозначены соответствующими строчными греческими буквами α , δ , ϵ , γ и μ соответственно. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно отнести, в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов, к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ).

[0125] В описании и прилагаемой формуле изобретения «Fc-рецептор» и «FcR» описывают рецептор, который связывается с Fc-областью антитела. FcR рассмотрены в Ravetch and Kinet, 1991, Ann. Rev. Immunol., 9:457–92; Capel et al., 1994, Immunomethods, 4:25–34; и de Haas et al., 1995, J. Lab. Clin. Med., 126:330–41. «FcR» также включает неонатальный рецептор, FcRn, отвечающий за перенос материнских IgG плоду (Guyer et al., 1976, J. Immunol., 117:587; и Kim et al., 1994, J. Immunol., 24:249).

[0126] При использовании в данном документе термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител. В целом отдельные антитела, содержащие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими и направлены против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. Модификатор «моноклональный» указывает на характер антитела, получаемого из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, подлежащие применению по настоящему изобретению, могут быть получены гибридным способом, впервые описанным Kohler and Milstein, 1975, Nature, 256:495, или могут быть получены способами с помощью рекомбинантной ДНК, например, описанными в патенте США № 4,816,567. Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговых библиотек, полученных с помощью методик, описанных, например, в McCafferty et al., 1990, Nature 348:552–554.

[0127] При использовании в данном документе «зависимая от антитела клеточная цитотоксичность» и «ADCC» относятся к опосредованной клеткой реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, натуральные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги) распознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис клетки-мишени. Активность ADCC представляющей интерес молекулы можно оценить с использованием

анализа ADCC *in vitro*, такого как описанный в патенте США № 5,500,362 или 5,821,337, или описанный в **примере 7** настоящего изобретения. Применимые эффекторные клетки для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) и НК-клетки. В качестве альтернативы или дополнения, активность ADCC представляющей интерес молекулы можно оценить *in vivo*, *например*, на животной модели, такой как раскрыта в Clynes et al., 1998, PNAS (USA), 95:652–656.

[0128] «Комплементзависимая цитотоксичность» или «CDC» относится к лизису клетки-мишени в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (*например*, антителом) в комплексе с когнатным антигеном. Для оценки активации комплемента может быть выполнен анализ CDC, *например*, как описано в Gazzano – Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

[0129] Антитело, которое «специфически связывается» с эпитопом, — термин, который хорошо известен в данной области, и способы определения такого специфического связывания также хорошо известны в данной области. Подразумевается, что молекула проявляет «специфическое связывание», если она реагирует или ассоциируется чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретной клеткой, белком или веществом, чем с альтернативными клетками, белками или веществами. Антитело «специфически связывается» или «предпочтительно связывается» с мишенью, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими веществами. Например, антитело, которое специфически или предпочтительно связывается с PD-1, представляет собой антитело, которое связывается с этим эпитопом с большей аффинностью, авидностью, легче и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими эпитопами. В качестве следующего примера, антитело (или другой фрагмент), которое может специфически или предпочтительно связываться с первой мишенью или не может специфически или предпочтительно связываться со второй мишенью. В частности, термин «специфическое связывание» или «предпочтительное связывание» не обязательно включает (хотя может включать) исключительное связывание. По существу, но не обязательно, ссылка на связывание означает предпочтительное связывание.

[0130] «Фрагмент» при применении к белку представляет собой усеченную форму нативного биологически активного белка, который может или не может сохранить по меньшей мере часть терапевтической и/или биологической активности. В данном документе термины «фрагмент антитела», «его антигенсвязывающий фрагмент» и «его фрагмент» при использовании со ссылкой на антитело используются взаимозаменяемо.

Идентичность последовательности

[0131] Идентичность последовательности относительно последовательностей антител к PD-1 или любых других аминокислотных последовательностей, идентифицированных в данном документе, определяется как процент аминокислотных остатков в запрашиваемой последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам второй эталонной полипептидной последовательности или ее части после выравнивания последовательностей и введения гэпов, при необходимости, для достижения максимальной процентной идентичности последовательности, а не с учетом каких-либо консервативных замен в качестве части идентичности последовательности. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть выполнено различными способами, известными специалисту в данной области, например, с помощью общедоступного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить нужные параметры для выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Процент идентичности может быть измерен по длине всей определенной полипептидной последовательности или может быть измерен по более короткой длине, например, по длине фрагмента, полученного из более крупной определенной полипептидной последовательности, например, фрагмента по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 70 или по меньшей мере 150 смежных остатков. Такие длины являются только иллюстративными, и понятно, что любая длина фрагмента, поддерживаемая последовательностями, показанными в данном документе, в таблицах, графических материалах или перечне последовательностей может быть использована для описания длины, по которой можно измерить процент идентичности. В некоторых вариантах осуществления процент идентичности определяют по всей длине указанной эталонной последовательности, такой как последовательность, представленная в данном документе. Например, сравнение последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями (или их более короткой длиной) по настоящему изобретению можно осуществлять с помощью компьютерной программы Blastp (BLAST белок-белок), предоставляемой онлайн Центром биотехнологической информации (NCBI). Процент идентичности аминокислотной последовательности данной аминокислотной последовательности А с данной аминокислотной последовательностью В (которая, в качестве альтернативы, может быть названа данной аминокислотной последовательностью А, которая имеет определенный % идентичности аминокислотной последовательности с

данной аминокислотной последовательностью В), рассчитывают формулой следующим образом:

$$\frac{X}{Y} \times 100\%,$$

где X представляет собой количество аминокислотных остатков, оцененных программой выравнивания последовательностей BLAST идентичными совпадениями при выравнивании A и B этой программой, и где Y представляет собой общее количество аминокислотных остатков в A или B, в зависимости от того, что короче.

[0132] Две полинуклеотидные или полипептидные последовательности называют «идентичными», если последовательность нуклеотидов или аминокислот в этих двух последовательностях одинакова при выравнивании для максимального соответствия. Сравнения двух последовательностей обычно выполняются путем сравнения последовательностей в окне сравнения для идентификации и сравнения локальных областей сходства последовательностей.

Программируемая клеточная гибель 1 (PD-1)

[0133] В некоторых аспектах в данном документе представлены композиции и способы, связанные с антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, которые связывают и агонизируют PD-1, рецептор, который может присутствовать на поверхности активированных лимфоцитов, включая Т-клетки, натуральные клетки-киллеры, В-клетки и моноциты, и на поверхности миелоидных клеток. Путь PD-1 может представлять собой критическую иммунную контрольную точку для регулирования ответа иммунных клеток, экспрессирующих PD-1.

[0134] Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, активация пути PD-1 может приводить к ингибированию активации иммунных клеток. Антитела, блокирующие передачу сигналов PD-1, используются у пациентов с раком для стимулирования противоопухолевых иммунных ответов.

[0135] Белок программируемой гибели клеток 1 (PD-1 или CD279) представляет собой белок суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) и представителя семейства B7–CD28. Он может состоять из одного внеклеточного IgV-подобного домена, однопроходной трансмембранной области и цитоплазматического хвоста, который содержит ITIM и ITSM. В некоторых случаях он является мономерным на клеточной поверхности, поскольку в нем отсутствует внеклеточный цистеин, обнаруженный в CD28, CTLA4 и ICOS, что позволяет этим молекулам образовывать ковалентные гомодимеры. В некоторых случаях PD-1 также экспрессируется на клетках иммунной системы, включая CD4 Т-клетки, CD8 Т-клетки, В-клетки, НКТ-клетки, моноциты, макрофаги и дендритные клетки. Он может быть

кратковременно активирован на высокоактивированных Т-клетках и постоянно активирован на истощенных Т-клетках. PD-1 может связываться с двумя лигандами, называемыми PD-L1 (PD-L1, CD279 или B7-H1) и PDL-2 (CD273 или B7-DC), каждый из которых содержит два домена IgSF в их внеклеточной области. PD-L1 может быть конститутивно экспрессирован на специализированных антигенпрезентирующих клетках (APC), таких как DC, макрофаги и В-клетки, и может быть индуцирован на негематопоэтических клетках во время воспаления для ограничения повреждения тканей, но также часто активирован на раковых клетках, что позволяет им подавлять противоопухолевые иммунные ответы.

[0136] При связывании со своими лигандами внутриклеточные тирозиновые мотивы к PD-1 могут стать фосфорилированными, а фосфорилированный ITSM может рекрутировать белковую фосфатазу SHP2 (и, возможно, SHP1). После привлечения к клеточной поверхности SHP2 отрицательно регулирует передачу сигналов клеток путем дефосфорилирования ITAM активирующих рецепторов (в частности, CD28) и других последующих медиаторов активационной передачи сигналов. Помимо подавления активации Т-клеток, передача сигналов PD-1 также может играть роль в образовании регуляторных Т-клеток (Treg). Используемый в данном документе термин «передача сигналов PD-1» может относиться к одному или более из фосфорилирования внутриклеточных тирозиновых мотивов PD-1, рекрутингу белка фосфатазы SHP2 и/или SHP1 или дефосфорилированию ITAM активирующих рецепторов или других последующих медиаторов активационной передачи сигналов. Антитело, раскрытое в данном документе, в некоторых случаях способствует передаче сигналов PD-1, *например*, способствует одному или более из фосфорилирования внутриклеточных тирозиновых мотивов молекулы PD-1, с которой антитело связывается, или молекулы PD-1, с которой антитело не связывается, но связывается с другой молекулой PD-1, которая экспрессируется на поверхности той же клетки, рекрутирования SHP2 и/или SHP1 или дефосфорилирования ITAM активирующих рецепторов или других последующих медиаторов активирующей передачи сигналов.

[0137] В некоторых аспектах в данном документе представлены антитела, композиции, их применения и способы их получения, которые могут обойти некоторые из вышеупомянутых и других проблем, известных в уровне техники, которые связаны с существующими антителами к PD-1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлены агонистические антитела к PD-1, которые способны инициировать передачу сигналов PD-1 для связывания с PD-L1 на эффекторных Т-клетках

без истощения регуляторных Т-клеток, экспрессирующих PD-1, или с минимальными эффектами истощения на регуляторных Т-клетках, экспрессирующих PD-1.

[0138] Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, при аутоиммунном заболевании экспрессия PD-L1 может быть повышена воспалительной средой (Keir et al. 2008) (García-Díaz et al. 2017), что повышает вероятность того, что PD-1 уже полностью захвачен в этих патологических условиях и, таким образом, обеспечивает ограниченный объем для дополнительного преимущества агонистического антитела. Однако в некоторых аспектах в данном документе представлены агонистические антитела к PD-1, которые могут обеспечивать дополнительный ингибирующий сигнал даже в присутствии захвата рецептора его природным лигандом PD-L1. В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела PD-1, раскрытые в данном документе, обладают ингибирующими эффектами на экспрессирующие PD-1 иммунные клетки, которые находятся в непосредственной близости от клеток, экспрессирующих PD-L1, или самого PD-L1, находятся в контакте с PD-L1 или имеют рецепторы PD-1, захватываемые PD-L1.

Последовательность антител

[0139] В настоящем описании в данном документе представлены композиции, терапевтические средства, наборы, векторы, последовательности нуклеиновых кислот, изготовление, культивирование и/или способы получения агонистического антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента или его функционального фрагмента, имеющего мутацию в Fc-области (FcR), повышающую селективность в отношении ингибирующего Fc-рецептора FcγR2B (CD23B) и тем самым усиливающую биологические эффекты активации PD-1, *например*, ингибирование активности или пролиферации иммунной клетки, которая экспрессирует молекулу PD-1, с которой связывается антитело, или содействие понижающей регуляции ответов иммунных клеток, экспрессирующих PD-1. В некоторых случаях агонистическое антитело к PD-1 усиливает взаимодействие между PD-1 и PD-L1. В некоторых случаях агонистическое антитело к PD-1 содействует последующей передаче сигналов PD-1, которая инициируется связыванием PD-L1. В некоторых случаях агонистическое антитело к PD-1 содействует последующей передаче сигналов PD-1 без увеличения или усиления взаимодействия между PD-1 и PD-L1. В некоторых случаях агонистическое антитело к PD-1 активирует или усиливает передачу сигналов PD-1 в отсутствие связывания PD-L1 с PD-1.

[0140] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент (*например*, выделенное антитело), представленное в данном документе, специфически связывается с PD-1 и усиливает взаимодействие PD-1, экспрессируемого на поверхности иммунной клетки, с PD-L1.

[0141] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент (*например*, выделенное антитело), представленное в данном документе, представляет собой антитело к PD-1, которое содержит переменную область тяжелой цепи, переменную область легкой цепи и Fc-область, а Fc-область антитела к PD-1 содержит аминокислотную замену, которая усиливает селективность в отношении ингибирующего Fc-рецептора FcγR2B, тем самым усиливая опосредованное PD-L1 инициирование PD-1 и усиливая взаимодействие PD-1/PD-L1, приводящее к снижению зависимой от антитела клеточной цитотоксичности (ADCC) против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки по сравнению с исходной молекулой, в которой отсутствует замена.

[0142] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела (*например*, выделенное антитело), представленное в данном документе, представляет собой антитело к PD-1, которое содержит переменную область тяжелой цепи, переменную область легкой цепи и Fc-область. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи антитела к PD-1 содержит CDR, содержащую последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под одним или более из SEQ ID NO: 1–3, с 0–3 аминокислотными модификациями. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи антитела к PD-1 содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 1–3, с 0–3 аминокислотными модификациями. В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи антитела к PD-1 содержит CDR, содержащую последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под одним или более из SEQ ID NO: 4–6, с 0–3 аминокислотными модификациями. В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи антитела PD-1 содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 4–6, с 0–3 аминокислотными модификациями. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела к PD-1 получена из молекулы IgG1 (*например* молекулы IgG1 человека) и содержит аминокислотную замену пролина (P) в аспарагиновую кислоту (D) в положении 238, пронумерованном в соответствии с нумерацией EU.

[0143] В некоторых случаях CDR переменной области тяжелой цепи антитела (или антигенсвязывающего фрагмента, далее именуемого «антитело», для представления полноразмерного антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела) содержит последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под

одним или более из SEQ ID NO: 1–3. В некоторых случаях CDR варибельной области тяжелой цепи антитела содержит последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 1–3. В некоторых случаях CDR антитела содержит последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 1–3, с одной аминокислотной модификацией. В некоторых случаях CDR варибельной области тяжелой цепи антитела содержит последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 1–3, с двумя аминокислотными модификациями. В некоторых случаях CDR варибельной области тяжелой цепи антитела содержит последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 1–3, с тремя аминокислотными модификациями.

[0144] В некоторых случаях антитело, представленное в данном документе, содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую три определяющих комплементарность области (CDRH), при этом CDRH1 имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO:1, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO:2, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 3, с 0–3 аминокислотными модификациями. В некоторых случаях антитело, представленное в данном документе, содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), при этом CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO:1, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO:2, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, с 0–3 аминокислотными модификациями. В некоторых случаях в варибельной области тяжелой цепи антитела CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO:1, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO:2, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3. В некоторых случаях в варибельной области тяжелой цепи антитела CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO:1, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO:2, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, с одной аминокислотной модификацией. В некоторых случаях в варибельной области тяжелой

цепи антитела CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO:1, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO:2, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, с двумя аминокислотными модификациями. В некоторых случаях в вариабельной области тяжелой цепи антитела CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO:1, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO:2, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, с тремя аминокислотными модификациями.

[0145] В некоторых случаях антитело, представленное в данном документе, содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR с аминокислотной последовательностью, представленной под одним или более из SEQ ID NO: 4–6, с 0–3 аминокислотными модификациями. В некоторых случаях CDR вариабельной области легкой цепи антитела содержит последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 4–6. В некоторых случаях CDR вариабельной области легкой цепи антитела содержит последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 4–6, с одной аминокислотной модификацией. В некоторых случаях CDR вариабельной области легкой цепи антитела содержит последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 4–6, с двумя аминокислотными модификациями. В некоторых случаях CDR вариабельной области легкой цепи антитела содержит последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 4–6, с тремя аминокислотными модификациями.

[0146] В некоторых случаях антитело, представленное в данном документе, содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую три определяющие комплементарность области легкой цепи, при этом CDRL1 имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 4, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 5, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 6, с 0–3 аминокислотными модификациями. В некоторых случаях антитело, представленное в данном документе, содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую три определяющие комплементарность области легкой цепи, при этом CDRL1 имеет

аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6, с 0–3 аминокислотными модификациями. В других вариантах осуществления переменная область легкой цепи антитела CDRL1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6. В других вариантах осуществления переменная область легкой цепи антитела CDRL1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6, с одной аминокислотной модификацией. В других вариантах осуществления переменная область легкой цепи антитела CDRL1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6, с двумя аминокислотными модификациями. В других вариантах осуществления переменная область легкой цепи антитела CDRL1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6, с тремя аминокислотными модификациями.

[0147] В некоторых случаях антитело, представленное в данном документе, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), при этом CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO:1, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO:2, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, с 0–3 аминокислотными модификациями, а переменная область легкой цепи содержит три определяющие комплементарность области легкой цепи, при этом CDRL1 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6, с 0–3 аминокислотными модификациями. В некоторых случаях CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO:1, CDRH2 имеет аминокислотную

последовательность, представленную под SEQ ID NO:2, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, и переменная область легкой цепи содержит три определяющих комплементарных области, где CDRL1 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6.

[0148] В некоторых случаях антитело (*например*, выделенное антитело), представленное в данном документе, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11.

[0149] В некоторых случаях представленное в данном документе антитело (*например*, выделенное антитело или «антитело» далее в данном документе) содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16. В некоторых случаях антитело, представленное в данном документе, содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16. В некоторых случаях антитело, представленное в данном документе, содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16. В некоторых случаях антитело, представленное в данном документе, содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16. В некоторых случаях антитело, представленное в данном документе, содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16. В некоторых случаях антитело, представленное в данном документе, содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью,

представленной под любым из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16. В некоторых случаях антитело, представленное в данном документе, содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 100% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16. В некоторых случаях антитело, представленное в данном документе, содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% и любое значение в диапазоне от этого значения до 100% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16.

[0150] В некоторых случаях антитело (*например*, выделенное антитело), представленное в данном документе, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), при этом VH содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, и VL содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16. В некоторых случаях антитело (*например*, выделенное антитело), представленное в данном документе, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), при этом VH содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11. В некоторых случаях антитело (*например*, выделенное антитело), представленное в данном документе, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), при этом VH содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11. В некоторых случаях антитело (*например*, выделенное антитело), представленное в данном документе, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), при этом VH содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичность с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11. В некоторых случаях антитело (*например*, выделенное антитело), представленное в данном документе, содержит переменную

область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), при этом VL содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16. В некоторых случаях антитело (*например*, выделенное антитело), представленное в данном документе, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), при этом VL содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16. В некоторых случаях антитело (*например*, выделенное антитело), представленное в данном документе, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), при этом VL содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 100% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16.

[0151] В некоторых случаях антитело (*например*, выделенное антитело), представленное в данном документе, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), при этом VH содержит последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, и VL содержит последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16.

[0152] В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь или легкая цепь, описанные в описании и прилагаемой формуле изобретения, также могут содержать константную область. Если молекула представляет собой полноразмерную молекулу антитела типа IgG, тяжелая цепь может содержать три константных домена.

[0153] В одном аспекте антитело, представленное в данном документе, содержит Fc-область, при этом указанная Fc-область получена из IgG1 человека. В некоторых случаях Fc-область антитела, представленного в данном документе, содержит аминокислотную замену, в которой пролин заменен аспарагиновой кислотой (D) в положении 238, пронумерованном в соответствии с нумерацией EU. В одном аспекте Fc-область антитела, представленного в данном документе, содержит аминокислотную замену, в которой пролин заменен аспарагиновой кислотой (D) в положении 238, пронумерованном в соответствии с нумерацией EU, и дополнительно содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 17. В другом аспекте Fc-область антитела, представленного в данном документе, содержит аминокислотную замену, в которой пролин

заменен аспарагиновой кислотой (D) в положении 238, пронумерованном в соответствии с нумерацией EU, и дополнительно содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 17. В одном аспекте Fc-область антитела, представленного в данном документе, содержит аминокислотную замену, в которой пролин заменен аспарагиновой кислотой (D) в положении 238, пронумерованном в соответствии с нумерацией EU, и дополнительно содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 17. В одном аспекте Fc-область антитела, представленного в данном документе, содержит аминокислотную замену, в которой пролин заменен аспарагиновой кислотой (D) в положении 238, пронумерованном в соответствии с нумерацией EU, и дополнительно содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 17. В одном аспекте Fc-область антитела, представленного в данном документе, содержит аминокислотную замену, в которой пролин заменен аспарагиновой кислотой (D) в положении 238, пронумерованном в соответствии с нумерацией EU, и дополнительно содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичность с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 17. В одном аспекте Fc-область антитела, представленного в данном документе, содержит аминокислотную замену, в которой пролин заменен аспарагиновой кислотой (D) в положении 238, пронумерованном в соответствии с нумерацией EU, и дополнительно содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 17. В одном аспекте Fc-область антитела, представленного в данном документе, содержит аминокислотную замену, в которой пролин заменен аспарагиновой кислотой (D) в положении 238, пронумерованном в соответствии с нумерацией EU, и дополнительно содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 99% идентичность с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 17. В одном аспекте Fc-область антитела, представленного в данном документе, содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 100% идентичности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 17.

[0154] В некоторых случаях антитело, раскрытое в данном документе, содержит переменную область тяжелой цепи, а Fc-область содержит аминокислотную замену, при этом переменная область тяжелой цепи содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 1–3, с 0–3 аминокислотными модификациями. В некоторых случаях антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и Fc-область, содержащую аминокислотную замену, при этом VH содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID

NO: 1–3. В некоторых случаях агонистическое антитело содержит VH и Fc-область, содержащую аминокислотную замену, при этом VH содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 1–3, с 1 аминокислотной модификацией. В некоторых случаях антитело содержит VH и Fc-область, содержащую аминокислотную замену, при этом VH содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 1–3, с 2 аминокислотными модификациями. В некоторых случаях антитело содержит VH и Fc-область, содержащую аминокислотную замену, при этом VH содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 1–3, с 3 аминокислотными модификациями;

[0155] В некоторых случаях агонистическое антитело содержит переменную область легкой цепи (VL) и Fc-область, содержащую аминокислотную замену, при этом переменная область легкой цепи содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 4–6, с 0–3 аминокислотными модификациями. В одном аспекте варианта осуществления агонистическое антитело содержит VL и Fc-область, содержащую аминокислотную замену, при этом область VL содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 4–6. В одном аспекте варианта осуществления агонистическое антитело содержит VL и Fc-область, содержащую аминокислотную замену, при этом область VL содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 4–6, с 1 аминокислотной модификацией. В одном аспекте варианта осуществления агонистическое антитело содержит VL и Fc-область, содержащую аминокислотную замену, при этом область VL содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 4–6, с 2 аминокислотными модификациями. В одном аспекте варианта осуществления агонистическое антитело содержит VL и Fc-область, содержащую аминокислотную замену, при этом область VL содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 4–6, с 3 аминокислотными модификациями.

[0156] В некоторых случаях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе, содержат переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, которые образуют структуру, выбранную из группы, состоящей из scFv, sc(Fv)₂, dsFv, Fab, Fab', (Fab')₂ и диатела.

Эффекторные функции

[0157] В некоторых случаях антитело, раскрытое в данном документе, агонизирует PD-1, например, PD-1 человека, экспрессируемый на поверхности иммунной клетки, такой как T-

клетка, В-клетка или макрофаг. В некоторых случаях антитело, раскрытое в данном документе, связывается с PD-1, экспрессируемым на поверхности эффекторной иммунной клетки, и снижает активацию и/или пролиферацию эффекторной иммунной клетки по сравнению с сопоставимой иммунной клеткой, не связанной указанным антителом.

[0158] В некоторых случаях антитело, раскрытое в данном документе, связывается с PD-1, экспрессируемым на иммунных клетках, и ингибирует активацию и/или пролиферацию клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело, раскрытое в данном документе, связывается с PD-1, экспрессируемым на иммунных клетках, и снижает активацию и/или пролиферацию иммунной клетки, когда иммунная клетка находится в непосредственной близости от клеток, экспрессирующих PD-L1. В некоторых случаях антитело, раскрытое в данном документе, оказывает агонистический эффект на передачу сигналов PD-1 в иммунной клетке в присутствии большого количества PD-L1 в окружающей среде. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, в некоторых случаях при аутоиммунных заболеваниях воспалительная среда активирует экспрессию PD-L1 (Keir et al. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:677–704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331; Garcia–Diaz et al. *Cell Rep.* 2017 May 9;19(6):1189–1201. doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.031), и, таким образом, возможно, что в такой воспалительной среде PD-1 уже полностью захватывается окружающим PD-L1, что ограничивает возможности для получения дополнительной пользы от известных агонистических антител, которые нацелены на PD-1. Антитела в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения могут дополнительно стимулировать передачу сигналов PD-1 в иммунной клетке даже в непосредственной близости от клеток, экспрессирующих PD-L1, что позволяет предположить, что антитело, раскрытое в данном документе, может быть особенно полезным для понижения регуляции иммунного ответа, *например*, в контексте аутоиммунных заболеваний, и, следовательно, может быть применимо для лечения нарушений, связанных с избыточным иммунным ответом, *например*, аутоиммунных заболеваний.

[0159] В некоторых вариантах осуществления антитело, раскрытое в данном документе, связывается с PD-1, экспрессируемым на иммунных клетках, и снижает активацию и/или пролиферацию иммунной клетки в отсутствие связывания PD-L1 с молекулой PD-1, которая связывается с антителом.

[0160] В некоторых случаях ингибирующий эффект антитела, раскрытого в данном документе, на активацию и/или пролиферацию иммунных клеток может быть измерен с помощью анализа NFAT-репортера, такого как описанный в **примере 4**. Например, анализ NFAT-репортера можно проводить с помощью Т-клеток Jurkat, которые сконструированы

для экспрессии люциферазы под контролем элемента ответа NFAT. В некоторых случаях Т-клетки Jurkat, экспрессирующие люциферазу под контролем элемента ответа NFAT, культивируют со стимуляторными клетками, которые выполнены с возможностью стимуляции Т-клеток Jurkat, такими как клетки BW5147 мыши, экспрессирующие конструкцию антитела к CD3 «стимуляторной Т-клетки» (TCS), как описано ранее (Leitner et al. 2010), и экспрессирующие FcγR2B человека, или клетки HEK293T, экспрессирующие конструкцию антитела к CD3 «стимуляторной Т-клетки» (TCS), как описано ранее (Leitner et al. 2010), и экспрессирующие FcγR2B человека. Совместное культивирование Т-клеток Jurkat со стимуляторными клетками в течение определенного периода времени плюс либо тестируемое антитело (*например*, иллюстративное антитело к PD-1 в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения) или изотипический контроль или некоторые другие контрольные антитела к PD-1. После инкубации с тестируемым антителом или контролем в течение определенного периода времени (*например*, 3 часа, 6 часов, 9 часов или 12 часов) клетки можно собрать для анализа люциферазы. Сигнал люминесценции может быть количественно определен как индикатор активации Т-клеток Jurkat.

[0161] В некоторых случаях ингибирующий эффект антитела, раскрытого в данном документе, на активацию и/или пролиферацию иммунных клеток (*например*, Т-клеток) можно измерить с помощью анализа активации иммунных клеток (*например*, анализа активации столбнячным анатоксином или анализа активации вирусным пептидом), *например*, описанного в **примере 5**. *Например*, иммунные клетки, такие как мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC), можно собирать и стимулировать с помощью столбнячного анатоксина (*например*, 0,5 мкг/мл) или вирусного пептида (*например*, пептида CEF HLA класса I – коммерчески доступной объединенной смеси пептидов из цитомегаловируса, вируса Эпштейна–Барр и гриппа) в присутствии блокирующих PD-L1/2 антител (*например*, 5 мкг/мл каждого) и определенной концентрации тестируемого антитела к PD-1 (*например*, иллюстративных антител согласно некоторым вариантам осуществления в данном документе) или изотипического контроля, или некоторых других контрольных антител. Высвобождение интерферона (*например*, IFNγ) из клеток (*например*, в супернатанте или среде для культивирования клеток) можно оценить с помощью ELISA или любого другого подходящего способа после инкубации с тестируемыми антителами в течение определенного периода времени (*например*, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов или одна неделя). Высвобождение интерферона можно измерить как индикатор активации иммунных клеток. В некоторых случаях продуцирование интерферона без стимуляционной обработки (*например*, обработки столбнячным

анатоксином или обработки вирусным пептидом) также может быть вычтена в виде нестимулированного фона из продуцирования интерферона при обработке.

[0162] В некоторых случаях ингибирующий эффект антитела, раскрытого в данном документе, на активацию и/или пролиферацию иммунных клеток (*например*, Т-клеток) может быть измерен с помощью анализа активации антителом к CD3/28, таким как описанный в **примере 6**. Например, иммунные клетки, такие как мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC), могут быть собраны и стимулированы растворимыми антителами к CD3 и антителами к CD28 (*например*, 0,5 нг/мл конечной концентрации каждого) в присутствии тестируемого антитела к PD-1 (*например*, иллюстративные антитела согласно некоторым вариантам осуществления в данном документе) или изотипического контроля, или некоторых других контрольных антител при определенной концентрации. Экспрессия CD25 на CD4 Т-клетках может быть оценена с помощью проточной цитометрии или любого другого способа в качестве маркера активации Т-клеток после инкубации с антителом в течение определенного периода времени (*например*, 24 часа, 48 часов, 72 часа или 96 часов).

[0163] В некоторых случаях ингибирующий эффект антитела, раскрытого в данном документе, на активацию и/или пролиферацию иммунных клеток (*например*, Т-клеток) может быть измерен по пролиферации клеток, продуцирования цитокинов, продуцирования хемокина или любых других маркеров активации иммунных клеток. Процент ингибирования, описанного в данном документе, измеряют путем нормализации считывания маркера активации иммунных клеток в клетках, обработанных заявленным антителом, против в остальном таких же клеток, но обработанных изотипическим контролем или не обработанных заявленным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело, раскрытое в данном документе, связывается с PD-1, экспрессируемым на иммунных клетках, и снижает активацию и/или пролиферацию иммунной клетки на по меньшей мере около 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% или 50%.

[0164] В некоторых случаях в отношении ингибирования активации иммунных клеток (*например*, активации Т-клеток) антитело, раскрытое в данном документе, имеет IC₅₀, составляющую не более около 0,5 нМ, не более около 0,2 нМ, не более около 0,15 нМ, не более около 0,1 нМ, не более около 0,09 нМ, не более около 0,08 нМ, не более около 0,07 нМ, не более около 0,06 нМ, не более около 0,05 нМ, не более около 0,04 нМ, не более около 0,03 нМ, не более около 0,02 нМ или не более около 0,01 нМ. В некоторых случаях в отношении ингибирования активации иммунных клеток (*например*, активации Т-клеток), антитело, раскрытое в данном документе, имеет IC₅₀ около 0,5 нМ, около 0,2 нМ, около 0,15 нМ, около 0,1 нМ, около 0,09 нМ, около 0,08 нМ, около 0,07 нМ, около 0,06 нМ, около

0,05 нМ, около 0,04 нМ, около 0,03 нМ, около 0,02 М или около 0,01 нМ. IC50 антитела, раскрытого в данном документе, в отношении ингибирования активации иммунных клеток (*например*, активации Т-клеток) может быть измерена в анализе иммунных клеток, таком как описанные выше и в примерах.

[0165] В некоторых случаях в данном документе представлен способ подавления иммунной клетки, которая экспрессирует PD-1, с использованием антитела, раскрытого в данном документе. Способ может включать приведение иммунной клетки, экспрессирующей PD-1, в контакт с антителом и снижение активации и/или пролиферации иммунной клетки на от около 10% до 50%. В некоторых случаях способ приводит к снижению активации и/или пролиферации иммунной клетки на от около 10% до 40%. В некоторых случаях способ приводит к снижению активации и/или пролиферации иммунной клетки на от около 10% до 30%. В некоторых случаях способ приводит к снижению активации и/или пролиферации иммунной клетки на от около 10% до 20%. В некоторых случаях способ приводит к снижению активации и/или пролиферации иммунной клетки на от около 10% до 15%. В некоторых случаях способ приводит к снижению активации и/или пролиферации иммунной клетки на от около 20% до 50%. В некоторых случаях способ приводит к снижению активации и/или пролиферации иммунной клетки на от около 20% до 40%. В некоторых случаях способ приводит к снижению активации и/или пролиферации иммунной клетки на от около 20% до 30%.

[0166] В некоторых случаях антитело, раскрытое в данном документе, усиливает взаимодействие PD-1, экспрессируемого на поверхности иммунной клетки, с PD-L1. Например, в некоторых случаях антитело, раскрытое в данном документе, усиливает связывание PD-L1 с молекулой PD-1, которая связывается с антителом. В некоторых случаях антитело, раскрытое в данном документе, усиливает связывание PD-L1 с одной или более молекулами PD-1 на поверхности иммунной клетки, которая не связана антителом, тогда как антитело связывается с другими молекулами PD-1 на поверхности иммунной клетки. В одном варианте осуществления антитело, раскрытое в данном документе, усиливает взаимодействие PD-1, экспрессируемого на поверхности иммунной клетки, с PD-L1, что определено с помощью анализа, такого как описанный в **примере 10**. В некоторых случаях антитело, раскрытое в данном документе, усиливает взаимодействие PD-1, экспрессируемого на поверхности иммунной клетки, с PD-L1, на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 150%, 180%, 200%, 300%, 400%, 500% или еще больше.

[0167] В некоторых случаях антитела, раскрытые в данном документе, имеют сниженную индукцию зависимой от антитела клеточной цитотоксичности (ADCC) против

экспрессирующих PD-1 регуляторных Т-клеток по сравнению с идентичной в остальном молекулой, которая содержит немодифицированную Fc-область IgG1, при этом имеет такой же или усиленный агонистический эффект на передачу сигналов PD-1 по сравнению с идентичной в остальном молекулой, которая содержит немодифицированную Fc-область IgG1. В некоторых случаях антитело, раскрытое в данном документе, имеет пониженную ADCC против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки, что определено с помощью анализа активации клеток-киллеров, такого как описанный в **примере 7**. В некоторых случаях антитело, раскрытое в данном документе, не приводит к значительной ADCC против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки, что определено с помощью анализа *in vitro*, такого как описанный в **примере 7** или *in vivo*, когда антитело вводят субъекту. В некоторых случаях антитело, раскрытое в данном документе, не вызывает дегрануляции натуральных клеток-киллеров или вызывает пониженный уровень дегрануляции по сравнению с идентичной в остальном молекулой, которая содержит немодифицированную Fc-область IgG1. В некоторых случаях антитело, раскрытое в данном документе, не приводит к смерти регуляторных Т-клеток или приводит к снижению уровня смерти регуляторных Т-клеток по сравнению с идентичной в остальном молекулой, которая содержит немодифицированную Fc-область IgG1. В некоторых вариантах осуществления антитело, раскрытое в данном документе, не вызывает дегрануляции естественных клеток-киллеров или смерти регуляторных Т-клеток или вызывает снижение дегрануляции естественных клеток-киллеров или смерти регуляторных Т-клеток по сравнению с идентичной в остальном молекулой, которая содержит немодифицированную Fc-область IgG1. Влияние на дегрануляцию натуральных клеток-киллеров и/или смерть регуляторных Т-клеток может быть измерено *in vivo* или *in vitro*, например, с помощью анализа, описанного в **примере 7**.

Аффинность связывания

[0168] Аффинность связывания гуманизованного варианта антитела к PD-1 для рецептора PD-1 человека или яванского макака или PD-1 другого животного может характеризоваться k_a , k_d или K_D . Термин « k_a », используемый в данном документе, относится к константе скорости ассоциации антитела с антигеном. Термин « k_d », используемый в данном документе, относится к константе скорости диссоциации антитела из комплекса антитело/антиген. Термины « K_D » или « KD », используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к константе равновесной диссоциации взаимодействия антитело–антиген. Для целей настоящего изобретения K_D определяется как соотношение двух кинетических констант скоростей k_a/k_d . Чем меньше константа равновесной диссоциации, тем плотнее заявленное антитело и PD-1 связываются друг с другом.

[0169] В некоторых случаях антитело, раскрытое в данном документе, связывает PD-1 человека с K_D менее 200 нМ, 100 нМ, 80 нМ, 60 нМ или 40 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С. В одном аспекте антитело, раскрытое в данном документе, связывается с PD-1 яванского макака с K_D менее 5000 нМ, 4000 нМ, 2000 нМ, 1000 нМ, 800 нМ, 600 нМ, 500 нМ, 400 нМ, 300 нМ или 200 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С.

[0170] В некоторых случаях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе, обладают повышенным связыванием с Fc γ R2B и пониженным связыванием с одним или более активирующими Fc γ рецепторами, такими как Fc γ R2A (*например*, аллотип 131R или аллотип 131H) или Fc γ R1A, по сравнению с исходной молекулой, в которой отсутствует замена Fc-области.

[0171] В некоторых случаях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе, обладают повышенным соотношением связывания с Fc γ R2B/Fc γ R2A (*например*, аллотип 131R или аллотип 131H) по сравнению с исходной молекулой, в которой отсутствует аминокислотная замена Fc-области. В некоторых случаях повышенное соотношение связывания Fc γ R2B/Fc γ R2A (*например*, аллотип 131R или аллотип 131H) является по меньшей мере 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 или 150-кратным по сравнению с исходной молекулой, в которой отсутствует замена Fc-области.

[0172] В некоторых случаях Fc-область антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, раскрытого в данном документе, связывается с Fc γ R2B с более высокой аффинностью относительно сопоставимого контрольного антитела, содержащего Fc-область, которая не содержит аминокислотную замену, указанную выше. В некоторых случаях антитело связывается с Fc γ R2B с константой диссоциации (K_D) не более около 5 мкМ, *например*, от около 5 мкМ до 0,1 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

[0173] В некоторых случаях Fc-область (FcR) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, раскрытого в данном документе, селективно связывается с Fc γ R2B. В некоторых случаях антитело связывается с Fc γ R2B с K_D не более 5 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

[0174] В некоторых случаях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с Fc γ R2B человека с K_D менее 5 мкМ, 4 мкМ, 3 мкМ или 2 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С. В некоторых случаях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с Fc γ R2B человека с K_D по меньшей мере 2 мкМ, 1 мкМ, 800 нМ,

600 нМ, 500 нМ, 400 нМ, 300 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 80 нМ, 60 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ или 5 нМ. В некоторых случаях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с FcγR2B человека с K_D от 200 нМ до 5 мкМ, от 400 нМ до 4 мкМ, от 500 нМ до 3,5 мкМ, от 800 нМ до 3 мкМ, от 1 мкМ до 5 мкМ, от 1 мкМ до 4,5 мкМ, от 1 мкМ до 4 мкМ, от 1 мкМ до 3,5 мкМ, от 1 мкМ до 3 мкМ, от 1 мкМ до 2,5 мкМ или от 1 мкМ до 2 мкМ.

[0175] В некоторых случаях антитело связывается с FcγR2A (*например*, аллотип 131R или аллотип 131H) с более низкой или равной аффинностью относительно исходной молекулы, при этом исходная молекула представляет собой эквивалентное антитело, в котором отсутствует замена Fc, которая обеспечивает молекуле антитела повышенное связывание и, следовательно, улучшает передачу сигналов FcγR2B.

[0176] В некоторых случаях, когда антитело содержит замену P238D, антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131R) с более низкой или равной аффинностью относительно сопоставимого контрольного антитела, которое содержит Fc-область, имеющую пролин в положении 238 (нумерация EU).

[0177] В некоторых случаях антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131R) с K_D более 5 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С. В некоторых случаях антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131R) с K_D более 10 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С. В некоторых случаях антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131R) с K_D по меньшей мере 15 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С. В конкретных вариантах осуществления антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131R) с K_D по меньшей мере 20 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С. В некоторых случаях антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131R) с K_D от около 15 мкМ до 25 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С.

[0178] В некоторых случаях антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131H) с K_D по меньшей мере 50 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С. В некоторых случаях антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131H) с K_D по меньшей мере 75 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С. В некоторых случаях антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131H) с K_D по меньшей мере 80 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С. В некоторых случаях антитело связывается с FcγR2A (аллотип 131H) с K_D по меньшей мере 90 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С. В некоторых случаях антитело

связывается с Fc γ R2A (аллотип 131H) с K_D от около 50 мкМ до около 100 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С. В некоторых случаях антитело связывается с Fc γ R2A (аллотип 131H) с K_D от около 75 мкМ до около 125 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С.

[0179] В некоторых случаях антитело имеет [значение K_D антитела в отношении Fc γ R2A (131R)]/[значение K_D антитела в отношении Fc γ R2B] 3 или более, например, по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Соответственно, это определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

[0180] В некоторых случаях антитело имеет [значение K_D антитела в отношении Fc γ R2A (131H)]/[значение K_D антитела в отношении Fc γ R2B] 10 или более, например, по меньшей мере 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50. Соответственно, это определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

[0181] В некоторых случаях антитело имеет [значение K_D антитела в отношении Fc γ R2A (131R)]/[значение K_D антитела в отношении Fc γ R2B] 3 или более, например, по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и/или [значение K_D антитела в отношении Fc γ R2A (131H)]/[значение K_D антитела в отношении Fc γ R2B] 10 или более, например, по меньшей мере 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50. Соответственно, это определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

[0182] В некоторых случаях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе, обладают повышенным соотношением связывания с Fc γ R2B/Fc γ R1A по сравнению с исходной молекулой, в которой отсутствует замена Fc-области по сравнению с последовательностью дикого типа. Соответственно, повышенное соотношение связывания Fc γ R2B/Fc γ R1A является по меньшей мере 1,1, 1,2, 1,5, 2, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250-кратным по сравнению с исходной молекулой, в которой отсутствует замена в Fc-области.

[0183] Под «по сравнению с исходной молекулой, в которой отсутствует замена в Fc-области», подразумевается сравнение с молекулой антитела, которая имеет аминокислотную последовательность, отличную от аминокислот, указанных в формуле изобретения, которые представляют замену в Fc относительно Fc дикого типа. Таким образом, связывание молекулы антитела с указанной заменой Fc или без нее с Fc γ R2B может быть измерено, и необязательно связывание молекулы антитела с указанной заменой Fc или без нее с активирующим Fc γ -рецептором, таким как Fc γ R2A (*например*, аллотип 131R или аллотип 131H) или Fc γ R1A, может быть измерено, *например*, с помощью SPR.

[0184] В некоторых случаях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе, имеют повышенное соотношение [значение K_D для связывания Fc γ R1A]/[значение K_D для связывания Fc γ R2B] по сравнению с исходной молекулой, в которой отсутствует замена Fc-области по сравнению с последовательностью дикого типа. Соответственно, отношение [значения K_D для связывания Fc γ R1A]/[значение K_D для связывания Fc γ R2B] для вариантной молекулы является по меньшей мере 1,1, 1,2, 1,5, 2, 5, 6, 7, 8, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 или 10 000-кратным относительно отношения [значения K_D для связывания Fc γ R1A]/[значение K_D для связывания Fc γ R2B] для исходной молекулы, в которой отсутствует замена Fc-области.

[0185] В некоторых случаях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе, имеют повышенное соотношение [значения K_D для связывания Fc γ R2A (131R)]/[значение K_D для связывания Fc γ R2B] по сравнению с исходной молекулой, в которой отсутствует замена Fc-области по сравнению с последовательностью дикого типа. Соответственно, соотношение [значение K_D для связывания Fc γ R2A (131R)]/[значение K_D для связывания Fc γ R2B] для вариантной молекулы является по меньшей мере 1,1, 1,2, 1,5, 2, 5, 10, 50 или 100-кратным относительно соотношения [значение K_D для связывания Fc γ R1A]/[значение K_D для связывания Fc γ R2B] для исходной молекулы, в которой отсутствует замена Fc-области.

[0186] В некоторых вариантах осуществления, представленных в данном документе, аффинность связывания каждого из гуманизированных вариантов антитела к PD-1 в отношении PD-1 человека, PD-1 яванского макака или PD-1 другого животного измеряют с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Система поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Biacore® (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс) может использоваться для измерения аффинности связывания заявленного антитела. Иллюстративные системы анализа SPR включают без ограничения приборы Biacore X100, Biacore T200, Biacore 3000 или Biacore 4000, а также коммерческие серии сенсорных чипов. При типичном применении систем Biacore кинетические показатели взаимодействия анализируют путем контроля взаимодействия как функции времени в диапазоне концентраций аналита, а затем аппроксимируют целый набор данных на математическую модель, описывающую взаимодействие. Фаза ассоциации (во время инъекции образца) содержит информацию о процессах ассоциации и диссоциации, в то время как во время фазы диссоциации происходит только диссоциация (после инъекции образца, когда поток буфера удаляет диссоциированные молекулы аналита). Специалисты в данной области могут выбирать или определять соответствующие параметры и/или условия для выполнения анализа

аффинности связывания в соответствии с руководством производителя. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания заявленного антитела определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С. В некоторых случаях аффинность связывания и кинетические показатели гуманизированных вариантов антител с PD-1 человека или яванского макака определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием Biacore 8K (Cytiva), например, как описано в **примере 2**.

Конструирование антител

[0187] В некоторых случаях антитело, раскрытое в данном документе, включает антитело человека. В некоторых вариантах осуществления антитело, раскрытое в данном документе, включает моноклональное гуманизированное антитело, химерное антитело или мультиспецифическое антитело. В некоторых случаях антитело, раскрытое в данном документе, включает моноклональное антитело.

[0188] Описанное в данном документе антитело может представлять собой моноклональное антитело, химерное антитело, человеческое или гуманизированное антитело. Термин «человеческое» антитело, используемый в данном документе, относится к антителу, имеющему переменные области, в которых как каркасные области, так и CDR-области происходят из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме этого, если антитело содержит константную область, то константная область также получена из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека могут включать остатки аминокислот, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (*например*, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro*, или соматическая мутация *in vivo*). Однако термин «антитело человека», используемый в данном документе, не предполагает включения антител, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты в каркасные последовательности человека. Термин «гуманизированное антитело», используемый в данном документе, не предполагает включения антител, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты в каркасные последовательности человека. В каркасных последовательностях человека могут быть сделаны дополнительные модификации каркасной области. Термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором последовательности переменной области происходят из одного вида, а последовательности константной области происходят от других видов, например, антитело, в котором последовательности переменной области происходят из антитела мыши, а последовательности константной области происходят из антитела

человека. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, представляет собой моноклональное антитело.

[0189] Заявленное антитело может быть получено с помощью процесса с гибридомой или процесса с рекомбинантной ДНК. Как описано в способе Kohler и Milstein (Nature, 256:495 (1975)), клетки, продуцирующие антитело, используемые на стадии слияния клеток для получения гибридом, представляют собой селезенки, клетки лимфатических узлов, лейкоциты периферической крови и т. д. животного (*например*, мыши, крысы, хомячка, кролика, обезьяны, козы), иммунизированного антигеном (PD-1, его частичным пептидом или клетками, экспрессирующими их). Также возможно применение клеток, продуцирующих антитела, путем обеспечения воздействия антигена в культуральной среде на вышеуказанные клетки или лимфоциты, предварительно выделенные из неиммунизированного животного. В качестве миеломных клеток можно использовать общеизвестные различные клеточные штаммы. Клетки, продуцирующие антитело, и клетки миеломы могут происходить от разных видов животных, если они взаимно совместимы. В некоторых случаях они имеют происхождение от одного и того же животного. Гибридомы, например, получают путем слияния клеток между клетками селезенки, полученными из иммунизированной антигеном мыши и клеток миеломы мыши, а последующим скринингом можно получать гибридомы, продуцирующие моноклональное антитело к PD-1. Моноклональное антитело к PD-1 может быть получено с помощью культуры гибридом или из асцитарной жидкости млекопитающего, которому вводили гибридомы.

[0190] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленной в данном документе, включает гуманизированное антитело. При получении гуманизированных антител выбор каркасных остатков может иметь решающее значение для сохранения высокой аффинности связывания. В принципе, каркасная последовательность из любого HuAb может служить в качестве матрицы для привития CDR; однако было показано, что прямая замена CDR в таком каркасе может привести к значительной потере аффинности связывания с антигеном. Glaser et al. (1992) J. Immunol. 149:2606; Tempest et al. (1992) Biotechnology 9:266; и Shalaby et al. (1992) J. Exp. Med. 17:217. Чем более гомологичен HuAb оригинальному muAb, тем меньше вероятность того, что каркас человека внесет искажения в мышинные CDR, которые могут снизить аффинность. На основании поиска гомологии последовательностей по базе данных последовательностей антител HuAb IC4 имеет хорошую гомологию каркаса с muM4TS.22, хотя другие высокогомологичные HuAb также будут подходящими, особенно цепи каппа-L из подгруппы I человека или цепи H человека из подгруппы III человека. Kabat et al. (1987). Различные компьютерные программы, такие как ENCAD (Levitt et al. (1983) J. Mol. Biol. 168:595), доступны для прогнозирования

идеальной последовательности для V-области. Таким образом, настоящее изобретение охватывает NuAb с различными V-областями. Специалист в данной области техники сможет определить подходящие последовательности V-области и оптимизировать эти последовательности. Способы получения антител с пониженной иммуногенностью также описаны в патенте США № 5,270,202 и в EP 6,997,55.

[0191] В некоторых вариантах осуществления антитело, раскрытое в данном документе, содержит вариабельную область тяжелой цепи и указанную вариабельную область легкой цепи, которые образуют структуру, выбранную из группы, состоящей из scFv, sc(Fv)₂, dsFv, Fab, Fab', (Fab')₂ и диатела.

[0192] В одном аспекте антитело, раскрытое в данном документе, содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит указанную вариабельную область тяжелой цепи, функционально связанную с указанной Fc-областью, и при этом легкая цепь содержит указанную вариабельную область легкой цепи. В одном случае антитело, раскрытое в данном документе, включает гуманизованное антитело. В другом аспекте антитело, раскрытое в данном документе, включает антитело человека. В другом варианте осуществления антитело, раскрытое в данном документе, выбрано из группы, состоящей из антитела человека, гуманизованного антитела, химерного антитела и мультиспецифического антитела. В некоторых случаях антитело, раскрытое в данном документе, представляет собой моноклональное антитело.

Гуманизация

[0193] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены варианты антитела, содержащие любые возможные комбинации гуманизованных доменов VH и VL. В некотором варианте осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит гуманизованные варианты VH агонистического антитела к PD-1, содержащего каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит гуманизованные варианты VL агонистического антитела к PD-1, содержащего каркасные последовательности человека.

[0194] Антитела, которые гуманизованы, могут сохранять высокую аффинность в отношении антигена и другие благоприятные биологические свойства. Для достижения этой цели в одном примере гуманизованные антитела к PD-1 получают способом анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизованных продуктов с использованием трехмерных моделей исходных и гуманизованных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулина известны специалистам в данной области. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают вероятные трехмерные конформационные структуры выбранных

последовательностей-кандидатов иммуноглобулина. Проверка этих отображений позволяет анализировать вероятную роль остатков в функционировании последовательности-кандидата иммуноглобулина и остатков, которые влияют на способность иммуноглобулина-кандидата связывать его антиген. Таким образом, остатки FR могут быть выбраны и объединены из консенсусной и импортной последовательности таким образом, чтобы достичь желаемой характеристики антитела, такой как повышенная аффинность в отношении целевого (ых) антигена(ов).

[0195] В некоторых случаях переменная область тяжелой цепи (VH) содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7. В некоторых случаях гуманизованная VH-цепь содержит каркас человека IGHV1-24*01. В некоторых вариантах осуществления гуманизованная VH-цепь содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления гуманизованная VH-цепь содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 9. В еще одном варианте осуществления гуманизованная VH-цепь содержит каркас человека IGHV7-4-1*02. В некоторых вариантах осуществления гуманизованная VH-цепь содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления гуманизованная VH-цепь содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 11.

[0196] В некоторых случаях переменная область легкой цепи (VL) содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12. В некоторых случаях гуманизованная VL-цепь содержит каркас человека IGKV1-39*01. В некоторых вариантах осуществления гуманизованная VL-цепь содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 13. В некоторых случаях гуманизованная VL-цепь содержит каркас человека IGKV3-11*01. В некоторых вариантах осуществления гуманизованная VL-цепь содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или 100% идентичностью последовательности с

последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления гуманизованная VL-цепь содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления гуманизованная VL-цепь содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или 100% идентичностью последовательности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 16.

Мутация

[0197] В некоторых вариантах осуществления, представленных в данном документе, антитело к PD-1, как описано в данном документе, может иметь одну или более мутаций или модификаций относительно эталонной последовательности. Мутация или модификация могут представлять собой делецию, вставку или добавление, или замену, или замену аминокислотного остатка. «Делеция» относится к изменению аминокислотной последовательности из-за отсутствия одного или более аминокислотных остатков. «Вставка» или «добавление» относится к изменениям в аминокислотной последовательности, что приводит к добавлению одного или более аминокислотных остатков по сравнению с эталонной последовательностью. «Замещение» или «замена» относится к замещению одной или более аминокислот различными аминокислотами. В контексте настоящего изобретения мутации заявленного антитела или его фракции по отношению к эталонной последовательности могут быть определены путем сравнения заявленного антитела или его фракции с эталонной последовательностью. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить в соответствии с любым из известных в уровне техники способов.

[0198] Мутация может быть идентифицирована по сайту мутации. Сайт мутации представляет собой положение на эталонной последовательности, где происходит модификация, такая как делеция, добавление или замена. Аминокислотные остатки на эталонной последовательности пронумерованы от N-конца к C-концу, а сайт мутации представляет собой нумерацию аминокислотного остатка, в отношении которого происходит делеция, добавление или замена. Например, положение 26 на эталонной последовательности представляет собой положение, в котором находится 26^{ой} аминокислотный остаток, начиная с N-конца.

Конъюгат антитела

[0199] В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, раскрытые в данном документе, слиты с сывороточными альбуминами. Слияние с сывороточными

альбуминами может улучшать фармакокинетику заявленного антитела, как описано в данном документе. Например, заявленное антитело или его фрагмент могут быть слиты с сывороточным альбумином. Сывороточный альбумин представляет собой глобулярный белок, который является наиболее распространенным белком крови у млекопитающих. Сывороточный альбумин продуцируется в печени и составляет приблизительно половину белков сыворотки крови. Он является мономерным и растворимым в крови. В некоторых вариантах осуществления заявленное антитело или его фрагмент могут быть слиты с сывороточным альбумином. В следующих вариантах осуществления сывороточный альбумин представляет собой человеческий сывороточный альбумин (HSA).

[0200] В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, раскрытые в данном документе, слиты с альбуминсвязывающим пептидом, который демонстрирует активность связывания с сывороточным альбумином, для увеличения периода полужизни заявленного антитела или его фрагмента. Альбуминсвязывающие пептиды, которые можно использовать в данном документе, включают без ограничения описанные *например*, в Dennis et al., *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043, 2002, и Miyakawa et al., *J. Pharm. Sci.* 102:3110-3118, 2013. В некоторых вариантах осуществления альбуминсвязывающий пептид слит генетически с заявленным антителом или его фрагментом, описанным в данном документе. В следующих вариантах осуществления альбуминсвязывающий пептид присоединен к заявленному антителу, описанному в данном документе, или его фрагменту посредством химических средств, *например*, химической конъюгации. В некоторых вариантах осуществления альбуминсвязывающий пептид может быть слит с N- или C-концом заявленного антитела или его фрагмента, описанного в данном документе. C-конец альбуминсвязывающего пептида может быть непосредственно слит с N-концом заявленного антитела через пептидную связь. В качестве альтернативы, N-конец альбуминсвязывающего пептида может быть непосредственно слит с C-концом заявленного антитела или его фрагмента через пептидную связь. В следующих вариантах осуществления карбоновая кислота на C-конце альбуминсвязывающего пептида может быть слита с внутренним аминокислотным остатком заявленного антитела или его фрагмента с использованием обычных способов химической конъюгации.

[0201] В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 или его фрагмент, раскрытые в данном документе, слиты с полимером, *например*, полиэтиленгликолем (ПЭГ). Антитело или его фрагмент можно пегилировать, например, для повышения биологического (*например*, в сыворотке) периода полужизни антитела или его фрагмента. Для пегилирования антитела антитело или его фрагмент, как правило, подвергают реакции с полиэтиленгликолем (ПЭГ), таким как реакционноспособное производное сложного

эфира или альдегида ПЭГ, в условиях, в которых одна или более групп ПЭГ присоединяются к антителу или фрагменту антитела. В некоторых случаях пегилирование осуществляют посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой ПЭГ (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). Используемый в данном документе термин «полиэтиленгликоль» охватывает любую из форм ПЭГ, которые были использованы для дериватизации других белков, таких как моно-(С1-С10)алкокси- или арилокси-полиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеимид. Можно использовать способы пегилирования белков, такие как, например, описанные в EP 0154316, Nishimura et al., и EP 0401384, Ishikawa et al. В некоторых вариантах осуществления полимер, *например*, ПЭГ может быть ковалентно присоединен к заявленному антителу или его фрагменту, описанному в данном документе, либо на N- или C-конце, либо во внутреннем местоположении с использованием обычных химических способов, *например*, химической конъюгации. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, фрагменты ПЭГ могут вносить вклад, после присоединения к антителу, описанному в данном документе, в растворимость в воде, высокую подвижность в растворе, отсутствие токсичности и низкую иммуногенность, увеличенный срок в кровотоке, повышенную стабильность, легкое выведение из организма и измененное распределение в организме.

[0202] Другие технологии продления периода полужизни, которые можно использовать для увеличения периода полужизни в сыворотке крови заявленных антител или их фрагмента, включают без ограничения XTEN (Schellenberger et al., *Nat. Biotechnol.* 27:1186-1192, 2009) и метку Albu (Trussel et al., *Bioconjug Chem.* 20:2286-2292, 2009).

[0203] В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 или его фрагмент, раскрытые в данном документе, конъюгированы с химически функциональным фрагментом. Как правило, фрагмент представляет собой метку, способную продуцировать выявляемый сигнал. Эти конъюгированные антитела или их фрагменты применимы, например, в системах выявления, таких как количественное определение опухолевой нагрузки а также визуализация метастатических очагов и визуализация опухоли. Такие метки известны в уровне техники и включают без ограничения радиоизотопы, ферменты, флуоресцентные соединения, хемилюминесцентные соединения, биолюминесцентные соединения, субстратные кофакторы и ингибиторы. См., например, патенты, описывающих применение таких меток: патенты США № 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; и 4,366,241. Элементы могут быть ковалентно связаны с антителом или его фрагментом, как описано в данном документе, рекомбинантно связаны или

конъюгированы с антителом или его фрагментом посредством вторичного реагента, такого как второе антитело, белок А или комплекс биотин-авидин.

[0204] Другие функциональные фрагменты включают сигнальные пептиды, средства, которые усиливают или уменьшают иммунологическую реактивность, средства, которые облегчают соединение с твердой подложкой, носители вакцины, модификаторы биологического ответа, парамагнитные метки и лекарственные средства. Сигнальный пептид представляет собой короткую аминокислотную последовательность, которая направляет вновь синтезированный белок через клеточную мембрану, обычно эндоплазматический ретикулум в эукариотических клетках, и либо внутреннюю мембрану, либо как внутреннюю, так и внешнюю мембраны бактерий. Сигнальные пептиды обычно находятся на N-концевой части полипептида и, как правило, удаляются ферментативно между биосинтезом и секрецией полипептида из клетки. Такой пептид может быть включен в заявленное антитело или его фрагмент для обеспечения секреции синтезированных молекул.

[0205] Средства, которые усиливают иммунологическую реактивность, включают без ограничения бактериальные суперантигены. Средства, способствующие соединению с твердой подложкой, включают без ограничения биотин или авидин. Иммуногенные носители включают без ограничения любые физиологически приемлемые буферы. Модификаторы биологического ответа включают цитокины, в частности, фактор некроза опухоли (TNF), интерлейкин-2, интерлейкин-4, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор и гамма-интерфероны.

[0206] Средства, снижающие иммунологическую реактивность, включают без ограничения противовоспалительные средства и иммунодепрессанты. Противовоспалительные средства включают нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID) и кортикостероиды. NSAID включают без ограничения салицилаты, такие как ацетилсалициловая кислота; дифлунизал, салициловую кислоту и салсалат; производные пропионовой кислоты, такие как ибупрофен; напроксен; дексипрофен, декскетопрофен, флурбипрофен, оксапрозин, фенпрофен, локсопрофен и кетопрофен; производные уксусной кислоты, такие как индометацин, диклофенак, толметин, ацеклофенак, сулиндак, набуметон, этодолак и кеторолак; производные енолиевой кислоты, такие как пироксикам, лорноксикам, мелоксикам, изоксикам, теноксикам, фенилбутазон и дроксикам; производные антралиновой кислоты, такие как мефенамовая кислота, флуфенамовая кислота, меклофенамовая кислота и толфенамовая кислота; селективные ингибиторы COX-2, такие как целекоксиб, лумиракоксиб, рофекоксиб, эторикоксиб, валдекоксиб, фирококсиб и парекоксиб; сульфонанилиды, такие как нимесулид; и другие,

такие как клониксин и ликофелон. Кортикостероиды включают без ограничения кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизон и преднизолон. Иммунодепрессанты включают без ограничения гидроксихлорохин, сульфасалазин, лефлуномид, этанерцепт, инфликсимаб, адалимумаб, D-пеницилламин, пероральное соединение золота, инъекционное соединение золота (внутримышечную инъекцию), миноциклин, тиомалат натрия золота, ауранофин, D-пеницилламин, лобензарит, буцилламин, актарит, циклофосфамид, азатиоприн, метотрексат, мизорибин, циклоспорин и такролимус.

[0207] Подходящие фрагменты лекарственного средства включают противоопухолевые средства. Неограничивающими примерами являются радиоизотопы, алкалоиды барвинка, такие как сульфаты винбластин, винкристина и виндезина, адриамицин, сульфат блеомицина, карбоплатин, цисплатин, циклофосфамид, цитарабин, дакарбазин, дактиномицин, гидрохлорид доксорубицина, гидрохлорид доксорубицина, этопозид, фторурацил, ломустин, гидрохлорид мехлорэтамидина, мелфалан, меркаптопурин, метотрексат, митомицин, митотан, пентостатин, пипоброман, гидрохлорид прокарбазина, стрептозотоцин, таксол, тиогуанин и урациловый иприт.

[0208] Иммунотоксины, включая одноцепочечные молекулы, могут быть получены с помощью рекомбинантных средств. Доступны различные иммунотоксины, и способы можно найти, например, в Monoclonal Antibody-toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet, Thorpe et al. (1982) Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, pp. 168-190; Vitatta (1987) Science 238:1098-1104; и Winter and Milstein (1991) Nature 349:293-299. Подходящие токсины включают без ограничения рицин, радионуклиды, антивирусный белок лаконоса, экзотоксин A Pseudomonas, дифтерийный токсин, цепь рицина A, грибковые токсины, такие как ферменты рестриктоцин и фосфолипаза. См., в целом, «Chimeric Toxins», Olsnes and Pihl, Pharmac. Ther. 15:355-381 (1981); и «Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy», eds. Baldwin and Byers, pp. 159-179, 224-266, Academic Press (1985).

[0209] Химически функциональные фрагменты могут быть получены рекомбинантно, например, путем создания слитого гена, кодирующего антитело и функциональный фрагмент. В качестве альтернативы, антитело или его фрагмент могут быть химически связаны с фрагментом любым из множества хорошо установленных химических процедур. Например, когда фрагмент представляет собой белок, можно использовать различные связующие средства, такие как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдителил)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат, имиотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl),

активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидо-соединения (такие как бис-(*p*-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(*p*-диазонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толиен-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Линкер может представлять собой «расщепляемый линкер», облегчающий высвобождение цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, может быть использован кислотнo-лабильный линкер, чувствительный к пептидазе линкер, диметиллинкер или линкер, содержащий дисульфид (Chari et al. Cancer Research, 52: 127-131 (1992)). Фрагменты могут быть ковалентно связаны или конъюгированы с помощью вторичного реагента, такого как второе антитело, белок А или комплекс биотин-авидин. Примеры парамагнитных фрагментов и их конъюгирования с антителами см., например, у Miltenyi et al. (1990) Cytometry 11:231-238.

[0210] В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 или его фрагмент, раскрытые в данном документе, представляют собой биспецифическое антитело. Биспецифические антитела представляют собой антитела, обладающие специфичностями связывания по меньшей мере с двумя разными эпитопами. Биспецифическое антитело, как описано в данном документе, может представлять собой биспецифическое антитело, которое распознает различные эпитопы на PD-1, или биспецифическое антитело, в котором один из антигенсвязывающих сайтов распознает PD-1, а другой антигенсвязывающий сайт распознает антиген, отличный от PD-1.

Молекулы нуклеиновых кислот

[0211] В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, кодируется одной или более молекулами нуклеиновой кислоты. В одном случае антитело кодируется одной молекулой нуклеиновой кислоты. В других случаях антитело кодируется двумя или более молекулами нуклеиновой кислоты. Например, поскольку антигенсвязывающий сайт, как правило, формируется путем сведения варибельной полипептидной области тяжелой цепи и варибельной полипептидной области легкой цепи, при этом эти две варибельные (тяжелая и легкая) полипептидные области кодируются отдельными молекулами нуклеиновой кислоты. В качестве альтернативы, например, в случае ScFv, они могут быть кодированы одной и той же молекулой нуклеиновой кислоты.

[0212] В соответствии с некоторыми аспектами настоящего изобретения предложена одна или более молекул нуклеиновой кислоты, которые кодируют антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

[0213] По первичной аминокислотной последовательности полипептида(ов), кодирующего(их) антитело, представленное в данном документе, специалист в данной области техники сможет определить подходящую(ие) нуклеотидную(ые) последовательность(и), кодирующую(ие) полипептид(ы), и, при необходимости, последовательность, являющуюся кодон-оптимизированной (*например*, см. Maugo and Chappell. Trends Mol Med. 20(11):604-613, 2014).

[0214] В соответствии с некоторыми аспектами настоящего изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид переменной области тяжелой цепи или полипептид переменной области легкой цепи по настоящему изобретению. Переменным полипептидом тяжелой цепи или переменным полипептидом легкой цепи по настоящему изобретению называются отдельные полипептидные цепи, которые включают аминокислоты, составляющие часть антигенсвязывающего сайта. В некоторых случаях полипептиды могут также содержать другие домены, такие как константные домены, шарнирные области и Fc-область, например, содержащие один или более сайтов связывания с Fc-рецептором.

[0215] В соответствии с некоторыми аспектами настоящего изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, которая содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептиды, способные образовывать антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению. В конкретных вариантах осуществления полипептиды могут также содержать другие домены, такие как константные домены, шарнирные области и Fc-область, например, содержащие один или более сайтов связывания с Fc-рецептором.

[0216] В одном случае молекула нуклеиновой кислоты кодирует только полипептидную последовательность, которая содержит VL-домен антитела или его фрагмент. В некоторых случаях молекула нуклеиновой кислоты может кодировать только полипептидную последовательность, которая содержит VH-домен антитела или его фрагмент. В других случаях молекула нуклеиновой кислоты кодирует как полипептидные последовательности VH и VL, так и полипептидные последовательности, способные образовывать антитело или фрагмент антитела по настоящему изобретению.

[0217] Молекула(ы) нуклеиновой кислоты, которая(ые) кодирует(ют) антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, может быть вектором или может быть частью вектора (такого как плазмидный вектор, космидный вектор, или вирусный вектор, или искусственная хромосома), который(ая) может содержать другие функциональные области (элементы), такие как один или более промоторов, одна или более точек начала репликации, один или более селективируемых маркеров и один или более других

элементов, обычно встречающихся в векторах экспрессии. Клонирование и экспрессия нуклеиновых кислот, кодирующих белки, включая антитела, хорошо установлены и известны специалистам в данной области.

Вектор

[0218] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения. В конкретных вариантах осуществления вектор представляет собой плазмидный вектор, космидный вектор, вирусный вектор или искусственную хромосому.

[0219] Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению, включая векторные нуклеиновые кислоты, которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды, способные образовывать антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающие фрагменты, могут присутствовать в очищенной/выделенной форме.

[0220] Выделенные/очищенные нуклеиновые кислоты, которые кодируют антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, не будут содержать или по существу не будут содержать материала, с которым они естественным образом ассоциированы, например, другие белки или нуклеиновые кислоты, с которыми они встречаются в естественной среде или в среде, в которой их получают (*например*, в клеточной культуре), если такое получение осуществляется с помощью технологии рекомбинантной ДНК, реализуемой *in vitro* или *in vivo*.

[0221] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению имеют чистоту более 80%, например более 90%, более 95%, более 97% и более 99%.

[0222] Таким образом, согласно некоторым аспектам настоящего изобретения предложен вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты или нуклеотидную последовательность, которая кодирует переменный полипептид тяжелой цепи или переменный полипептид легкой цепи по настоящему изобретению. В конкретном варианте осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует переменные области тяжелой и легкой цепей. В некоторых вариантах осуществления полипептиды содержат другие домены, такие как константные домены, шарнирные области и Fc-область, такие как содержащие один или более сайтов связывания с Fc-рецептором.

[0223] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота и/или вектор по настоящему изобретению могут быть введены в клетку-хозяина. В случае эукариотических клеток, например, подходящие методики включают трансфекцию с фосфатом кальция, DEAE-декстраном, электропорацию, опосредованную липосомами трансфекцию и

трандукцию с использованием ретровируса или другого вируса, *например*, вируса осповакцины или, в случае клеток насекомых, бакуловируса. В одном аспекте при введении нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина, в частности, в эукариотическую клетку, используют систему на основе вируса или плазмиды. В некоторых случаях плазмидная система поддерживается эписомой. В других случаях плазмидная система включена в клетку-хозяина или в искусственную хромосому. В конкретном варианте осуществления включение осуществляют путем случайной интеграции одной или более копий в один или множество локусов. В некоторых вариантах осуществления включение осуществляют путем целевой интеграции одной или более копий в один или множество локусов. В случае бактериальных клеток подходящие методики включают, например, трансформацию с хлоридом кальция, электропорацию и трансфекцию с использованием бактериофага.

[0224] В одном варианте осуществления нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению интегрируют в геном (*например*, в хромосому) клетки-хозяина. В конкретном варианте осуществления интеграцию обеспечивают путем включения последовательностей, которые способствуют рекомбинации с геномом, в соответствии со стандартными методиками.

Клетки-хозяева

[0225] В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту, раскрытую в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такая клетка-хозяин находится *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин находится в культуре.

[0226] В некоторых случаях клетка-хозяин принадлежит любому виду, такому как бактерия или дрожжи. В других случаях клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка человека или клетка грызуна, например, клетка НЕК293Т или клетка СНО-K1.

[0227] Таким образом, в соответствии с некоторыми аспектами настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты или вектор в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

[0228] В некоторых случаях клетка-хозяин может быть обработана так, чтобы вызывать или допускать экспрессию белка по настоящему изобретению из нуклеиновой кислоты, *например*, путем культивирования клеток-хозяев в условиях, подходящих для экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления очистку экспрессированного продукта можно обеспечить способами, известными специалисту в данной области техники.

[0229] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению, включая векторные нуклеиновые кислоты, которые содержат нуклеотидные

последовательности, кодирующие полипептиды для антител по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты, присутствуют в выделенной клетке-хозяине. В некоторых случаях клетка-хозяин является частью клональной популяции клеток-хозяев. Как используется в данном документе, ссылка на клетку-хозяина также охватывает клональную популяцию этой клетки. Клональная популяция является популяцией, которая была выращена из одной исходной клетки-хозяина. В некоторых случаях клетка-хозяин принадлежит любому подходящему организму. В некоторых случаях клетка-хозяин представляет собой, например, бактериальные, грибковые или клетки млекопитающих.

[0230] В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин способствует амплификации векторной нуклеиновой кислоты (такой как плазида). В конкретном варианте осуществления клетка-хозяин служит в качестве биологической фабрики для экспрессии полипептида(ов) по настоящему изобретению, который(ые) образует(ют) антитело к PD-1 или его фрагмент, описанные в данном документе. В одном случае подходящим хозяином для амплификации векторной нуклеиновой кислоты является бактериальная или грибковая клетка, такая как клетка *Escherichia coli* или клетка *Saccharomyces cerevisiae*. В других случаях подходящий хозяин для экспрессии белков по настоящему изобретению (*m. e.* полипептидов, которые образуют антитело к PD-1 или его фрагмент по настоящему изобретению) представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка НЕК293Т или СНО-К1. В конкретном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка НЕК293Т или СНО-К1.

[0231] Различные системы векторов экспрессии хозяина подходят для экспрессии антитела к PD-1 или его фрагмента, как описано в данном документе. Различные клетки-хозяева обладают характерными и специфическими механизмами пост-трансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Для обеспечения правильной модификации и процессинга белка по настоящему изобретению отбирают подходящие клеточные линии или системы-хозяева. В некоторых вариантах осуществления используют эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным аппаратом для надлежащего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева из млекопитающих включают, без ограничений, клетки СНО, НЕК, VERY, ВНК, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NS0, CRL7030 и HsS78Bst.

Изготовление антител

[0232] Антитело к PD-1 или его фрагмент, раскрытые в данном документе, могут быть получены в виде рекомбинантного антитела путем клонирования ДНК, кодирующей заявленное антитело или заявленный пептид из гибридом или В-клеток, или любую форму

библиотек антитела и/или фрагмента антитела, интеграции клона в подходящий вектор и трансдукции вектора в клетки-хозяева (например, P. J. Delves, *Antibody Production: Essential Techniques*, 1997 WILEY, P. Shepherd and C. Dean *Monoclonal Antibodies*, 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS, Vandamme A. M. et al., *Eur. J. Biochem.* 192:767-775 (1990)). Таким образом, в одном аспекте, представленном в данном документе, предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент по настоящему изобретению.

[0233] Нуклеотидные последовательности, соответствующие различным областям L или H цепей существующего антитела, могут быть легко получены и секвенированы с использованием традиционных методик, включая, без ограничения гибридикацию, ПЦР и секвенирование ДНК. Клетки гибридомы, которые продуцируют моноклональные антитела, служат одним источником нуклеотидных последовательностей антитела. Большое количество клеток гибридомы, продуцирующих массив моноклональных антител, может быть получено из общедоступных или закрытых хранилищ. Наибольшим депозитарным агентом является Американская коллекция типовых культур, которая предлагает разнообразную коллекцию хорошо охарактеризованных линий гибридом. В качестве альтернативы, нуклеотиды антител могут быть получены из иммунизированных или неиммунизированных грызунов или людей, а также из таких органов, как селезенка, и из лимфоцитов периферической крови. Конкретные методики, применимые для экстракции и синтеза нуклеотидов антитела, описаны в Orlandi et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 3833-3837, Larrick et al. 1989) *biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 1250-1255; Sastry et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 86: 5728-5732; и патенте США № 5,969,108.

[0234] Нуклеотидные последовательности антитела к PD-1 также могут быть модифицированы, например, путем замены кодирующей последовательности константными областями тяжелой и легкой цепей человека вместо гомологичных отличных от человеческих последовательностей. Таким образом получают химерные антитела, которые сохраняют специфичность связывания исходного антитела.

[0235] Кроме того, полинуклеотиды, кодирующие тяжелые и/или легкие цепи антитела к PD-1 или его функционального фрагмента, могут быть подвергнуты кодон-оптимизации для достижения оптимизированной экспрессии заявленного антитела или его функционального фрагмента в желаемой клетке-хозяине. Например, в одном способе кодон-оптимизации нативный кодон замещен наиболее частым кодоном из эталонного набора генов, при этом скорость трансляции кодонов для каждой аминокислоты должна быть высокой. Дополнительные примеры способов создания кодон-оптимизированных полинуклеотидов для экспрессии желаемого белка, которые могут быть применены к тяжелой и/или легкой цепям антитела к PD-1 или его функционального фрагмента, описаны

в Kanaya et al., *Gene*, 238:143-155 (1999), Wang et al., *Mol. Biol. Evol.*, 18(5):792–800 (2001), патенте США № 5,795,737, публикации патентного документа США № 2008/0076161 и WO 2008/000632.

[0236] Полинуклеотиды антитела к PD-1 по настоящему изобретению включают кодирующие их функциональные эквиваленты и их фрагменты иллюстративных полипептидов. Функциональные эквиваленты могут представлять собой полипептиды, имеющие консервативные аминокислотные замены, аналоги, включая слияния, и мутанты.

[0237] Из-за вырожденности генетического кода может существовать значительное изменение нуклеотидов L и H последовательностей, а также последовательности гетеродимеризации, подходящие для конструирования полинуклеотида и векторов по настоящему изобретению. Эта вариация охватывается настоящим изобретением.

[0238] При желании рекомбинантные полинуклеотиды могут содержать гетерологичные последовательности, которые облегчают обнаружение экспрессии и очистки продукта гена. Примеры таких последовательностей включают те, которые кодируют репортерные белки, такие как β -галактозидаза, β -лактамаза, хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT), люцифераза, зеленый флуоресцентный белок (GFP) и их производные. Другие гетерологичные последовательности, которые облегчают очистку, могут кодировать эпитопы, такие как Мус, HA (полученные из гемагглютинина вируса гриппа), His-6, FLAG или Fc-участок иммуноглобулина, глутатион-S-трансфераза (GST) и мальтозасвязывающий белок (MBP).

[0239] Полинуклеотиды могут быть конъюгированы с различными химически функциональными фрагментами, как описано выше. Обычно используемые фрагменты включают метки, способные продуцировать обнаруживаемый сигнал, сигнальные пептиды, средства, которые усиливают или уменьшают иммунологическую реактивность, средства, которые облегчают связывание с твердой подложкой, носители вакцины, модификаторы биологического ответа, парамагнитные метки и лекарственные средства. Фрагменты могут быть ковалентно связаны с полинуклеотидом, рекомбинантным или другими способами, известными в уровне техники.

[0240] Полинуклеотиды могут содержать дополнительные последовательности, такие как дополнительные кодирующие последовательности в пределах одного и того же блока транскрипции, контролирующие элементы, такие как промоторы, сайты связывания рибосомы и сайты полиаденилирования, дополнительные единицы транскрипции под контролем одного и того же или другого промотора, последовательности, которые позволяют клонирование, экспрессию и трансформацию клетки-хозяина, и любую такую

конструкцию, которая может быть желательной в соответствии с любым из различных вариантов осуществления, описанных в данном документе.

[0241] Полинуклеотиды могут быть получены с использованием способов химического синтеза, рекомбинантных способов клонирования, ПЦР или любой их комбинации. Специалист в данной области техники может использовать данные о последовательности, представленные в данном документе, для получения требуемого полинуклеотида с использованием синтезатора ДНК или заказа коммерческой услуги.

[0242] Полинуклеотиды, содержащие желаемую последовательность, могут быть вставлены в подходящий вектор, который, в свою очередь, может быть введен в подходящую клетку-хозяина для репликации, амплификации и экспрессии. Соответственно, в одном аспекте в данном документе представлены различные векторы, содержащие один или более полинуклеотидов согласно настоящему изобретению. Также предложена селективируемая библиотека векторов экспрессии, содержащая по меньшей мере один вектор, кодирующий заявленное антитело.

[0243] В некоторых аспектах в данном документе предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая по меньшей мере часть тяжелой цепи или легкой цепи антитела или его фрагмента, раскрытого в данном документе. В некоторых аспектах в данном документе предложен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, описанную в данном документе.

[0244] Векторы по настоящему изобретению, как правило, относятся к векторам клонирования и экспрессии. Векторы клонирования применимы для получения реплицированных копий полинуклеотидов, которые они содержат, или в качестве средства хранения полинуклеотидов в депозитарии для будущего восстановления. Векторы экспрессии (и клетки-хозяева, содержащие эти векторы экспрессии) можно использовать для получения полипептидов, полученных из полинуклеотидов, которые они содержат. Подходящие векторы клонирования и экспрессии включают любые известные в уровне техники *например*, для применения в системах экспрессии бактерий, млекопитающих, дрожжей, насекомых и фагового дисплея.

[0245] Подходящие векторы клонирования могут быть сконструированы в соответствии со стандартными методиками или выбраны из большого числа векторов клонирования, доступных в данной области. Хотя выбранный вектор клонирования может варьироваться в зависимости от клетки-хозяина, предназначенной для применения, применимые векторы клонирования, как правило, будут иметь возможность самостоятельно реплицироваться, может иметь одну мишень для конкретной эндонуклеазы рестрикции или нести содержать маркерные гены. Подходящие примеры включают плазмиды и бактериальные вирусы,

например, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, pUC18, mp18, mp19, фаговые ДНК (включая ДНК филаментных и нефиламентных фагов) и челночные векторы, такие как pSA3 и pAT28. Эти и другие векторы клонирования доступны от коммерческих поставщиков, таких как Clontech, BiORad, Stratagene и Invitrogen.

[0246] Векторы экспрессии, содержащие эти нуклеиновые кислоты, применимы для получения систем векторов-хозяев для получения белков и полипептидов. Как правило, эти векторы экспрессии реплицируются в организмах-хозяевах либо как эписомы, либо как неотъемлемая часть хромосомной ДНК. Подходящие векторы экспрессии включают плазмиды, вирусные векторы, включая фагмиды, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы, космиды и т. д. Доступен ряд векторов экспрессии, подходящих для экспрессии в эукариотических клетках, включая клетки дрожжей, птиц и млекопитающих. Одним из примеров вектора экспрессии является pcDNA3 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), с которым транскрипция управляется ранним промотором/энхансером цитомегаловируса (CMV). Два типа особенно применимых векторов экспрессии для экспрессии заявленного антитела, как описано в данном документе, представляют собой вектор фагового дисплея и вектор бактериального дисплея.

[0247] Векторы по настоящему изобретению могут содержать последовательности контроля транскрипции или трансляции, необходимые для экспрессии кодируемого антитела. Подходящие последовательности контроля транскрипции или трансляции включают без ограничения точку начала репликации, промотор, энхансер, связывающие репрессор области, сайты инициации транскрипции, сайты связывания рибосомы, сайты инициации трансляции и сайты терминации для транскрипции и трансляции.

[0248] Вектор экспрессии может быть перенесен в клетку-хозяина, а трансфицированные клетки затем культивируют для получения заявленного антитела или его функционального фрагмента. Таким образом, в одном аспекте в данном документе представлены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий заявленное антитело или его функциональный фрагмент, функционально связанный с гетерологичным промотором. Клетка-хозяин может быть совместно трансфицирована двумя векторами экспрессии, при этом первый вектор кодирует полипептид, полученный из тяжелой цепи, и второй вектор, кодирующий полипептид, полученный из легкой цепи. Два вектора могут содержать идентичные селективируемые маркеры, которые обеспечивают равную экспрессию полипептидов тяжелой и легкой цепей. В качестве альтернативы, можно использовать один вектор, который кодирует и способен экспрессировать полипептиды и тяжелой, и легкой цепей. В таких ситуациях легкая цепь может быть размещена до тяжелой цепи, чтобы

избежать избытка токсической свободной тяжелой цепи (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; и Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197-2199).

[0249] Для экспрессии заявленного антитела или его функционального фрагмента можно использовать различные системы векторов экспрессии хозяина (см., *например*, патент США № 5,807,715). Такие системы экспрессии хозяина представляют собой среды-носители, за счет которых представляющие интерес кодирующие последовательности могут быть получены и впоследствии очищены, но также представляют собой клетки, которые при трансформации или трансфекции соответствующими нуклеотидными кодирующими последовательностями экспрессируют молекулу заявленного антитела *in situ*. К ним относятся, без ограничения микроорганизмы, такие как бактерии (*например*, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные рекомбинантной ДНК бактериофага, векторами экспрессии плазмидной ДНК или косметической ДНК, содержащими кодирующие антитело последовательности; дрожжи (*например*, *Saccharomyces pichia*), трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии дрожжей, содержащими кодирующие антитело последовательности; системы клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными векторами экспрессии вируса (*например*, бакуловируса), содержащими кодирующие антитело последовательности; системы растительных клеток, инфицированные рекомбинантными векторами экспрессии вируса (*например*, вируса мозаики цветной капусты, CaMV; вируса табачной мозаики, TMV), или трансформированные рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (*например*, плазмиды Ti), содержащими кодирующие антитело последовательности; или системы клеток млекопитающих (*например*, клеток COS, CHO, ВНК, 293, NSO и 3T3), несущие рекомбинантные конструкции экспрессии, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (*например*, промотор металлотioneина) или из вирусов млекопитающих (*например*, поздний промотор аденовируса; промотор вируса осповакцины 7.5К). Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как промоторный элемент основного промежуточного-раннего гена из цитомегаловируса человека, являются эффективной системой экспрессии для антител (Foelcking et al., 1986, Gene 45:101; и Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8:2). В некоторых вариантах осуществления антитела или их фрагменты продуцируются в клетках CHO.

[0250] Для бактериальных систем ряд векторов экспрессии может быть преимущественно выбран в зависимости от применения, предназначенного для экспрессии молекулы антитела. Например, при продуцировании большого количества такого антитела или его фрагмента для создания фармацевтических композиций молекулы антитела могут быть

желательными векторы, которые направляют экспрессию высоких уровней продуктов слитого белка, которые легко очищаются. Такие векторы включают без ограничения вектор экспрессии *E. coli* pUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO 12:1791), в котором кодирующая антитело последовательность может быть отдельно лигирована в вектор в рамке с кодирующей областью *lac Z*, так что продуцируется слитый белок; векторы pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101–3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503–5509) и т. п. Векторы pGEX также могут быть использованы для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион-S-трансферазой (GST). Как правило, такие слитые белки растворимы и легко могут быть очищены из лизированных клеток путем адсорбции и связывания с матричными гранулами глутатион-агарозы с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX разработаны так, чтобы включать сайты расщепления протеазой тромбина или фактора Ха, так что продукт клонированного целевого гена может быть высвобожден из фрагмента GST.

[0251] В системе насекомых в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов можно использовать вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV). Вирус растет в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодирующая последовательность антитела или функционального фрагмента может быть клонирована индивидуально в несущественные области (например, ген полиэдрина) вируса и помещен под контроль промотора AcNPV (например, промотора полиэдрина).

[0252] В клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать ряд систем экспрессии на основе вируса. В тех случаях, когда в качестве вектора экспрессии используется аденовирус, представляющая интерес последовательность, кодирующая антитело, может быть лигирована с комплексом контроля транскрипции/трансляции аденовируса, например, поздняя промоторная и трехкомпонентная лидерная последовательность. Этот химерный ген затем может быть вставлен в геном аденовируса путем рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Вставка в несущественную область вирусного генома (например, область E1 или E3) приведет к получению рекомбинантного вируса, который является жизнеспособным и способен экспрессировать молекулу антитела в инфицированных хозяевах (например, см. Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (8) 1:355–359). Специфические сигналы инициации также могут использоваться для эффективной трансляции вставленных кодирующих антитело последовательностей. Эти сигналы включают кодон инициации ATG и смежные последовательности. Кроме того, кодон инициации должен находиться в фазе с рамкой считывания желаемой кодирующей последовательности для обеспечения трансляции всей вставки. Эти экзогенные сигналы трансляционного контроля и

инициирующие кодоны могут быть самого разного происхождения, как природного, так и синтетического. Эффективность экспрессии может быть усилена путем включения соответствующих элементов энхансера транскрипции, терминаторов транскрипции и т. д. (см., *например*, Bittner et al., 1987, *Methods in Enzymol.* 153:51–544).

[0253] Для растительных клеток в уровне техники доступны различные методики векторной доставки. Клетки-хозяева могут быть в форме целых растений, выделенных клеток или протопластов. Иллюстративные процедуры введения векторов в растительные клетки включают опосредованную *Agrobacterium* трансформацию растения, трансформацию протопластов, перенос генов в пыльцу, инъекцию в репродуктивные органы и инъекцию в незрелые зародыши. Как очевидно специалисту в данной области, каждый из этих способов имеет различные преимущества и недостатки. Таким образом, один конкретный способ введения векторов в конкретный вид растения может не обязательно быть наиболее эффективным для другого вида растения.

[0254] Кроме того, может быть выбран штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию вставленных последовательностей или модифицирует и процессирует продукт гена специфическим образом. Такие модификации (*например*, гликозилирование) и процессинг (*например*, расщепление) белковых продуктов может быть важным для функции антитела или функционального фрагмента. Различные клетки-хозяева обладают характерными и специфическими механизмами пост-трансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Можно подобрать подходящие клеточные линии или системы-хозяева для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессированного чужеродного белка. Для этого можно применять эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным аппаратом для надлежащего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают без ограничения клетки CHO, VERO, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NSO (клеточная линия миеломы мыши, которая не эндогенно не продуцирует цепи иммуноглобулина), CRL7030 и HsS78Bst.

[0255] Для долгосрочного высокопродуктивного получения рекомбинантных белков предпочтительной является стабильная экспрессия. Например, могут быть сконструированы клеточные линии, которые стабильно экспрессируют антитело или его функциональный фрагмент. Вместо использования векторов экспрессии, которые содержат вирусные точки начала репликации, клетки-хозяева могут быть трансформированы ДНК, контролируемой соответствующими элементами контроля экспрессии (*например*, промотор, энхансер, последовательности, терминаторы транскрипции, сайты

полиаденилирования и т. д.), и селективируемым маркером. После введения чужеродной ДНК может быть обеспечен рост сконструированных клеток в течение 1–2 дней в обогащенной среде с последующим переводом на селективную среду. Селективируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость к фактору отбора и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в их хромосомы и расти с образованием фокусов, которые, в свою очередь, могут быть клонированы и размножены в клеточные линии. Этот способ может преимущественно использоваться для конструирования клеточных линий, которые экспрессируют молекулу антитела.

[0256] Можно использовать ряд систем отбора, включая без ограничения системы с использованием генов тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler et al., 1977, *Cell* 11:223), гипоксантинеганинфосфорибозилтрансферазы (Szybalska & Szybalski, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:202) и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy et al., 1980, *Cell* 22:8-17) в tk-, hgprr- или aprt-клетках, соответственно. Кроме того, устойчивость к антиметаболиту может быть использована в качестве основы для отбора следующих генов: dhfr, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77(6): 3567–70; O'Hare et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527); глутаминсинтетаза (GS), которая является ферментом, ответственным за биосинтез глутамина с использованием глутамата и аммиака (Bebbington et al., 1992, *Biotechnology* 10:169); gpt, который придает устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan & Berg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072; neo, что придает устойчивость к аминогликозиду G-418 (Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573–596; Mulligan, 1993, *Science* 260:926-932; и Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191–217; May, 1993, *TIB TECH* 11(5):155-215); и hygro, который придает устойчивость к гигромицину (Santerre et al., 1984, *Gene* 30:147). Способы технологии рекомбинантной ДНК можно применять для отбора желаемого рекомбинантного клона, и такие способы описаны, например, в Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); и в главах 12 и 13 Dracopoli et al. (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., 1981, *J. Mol. Biol.* 150:1, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки. Уровни экспрессии молекулы антитела могут быть увеличены путем амплификации вектора (для обзора см. Bebbington and Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)). Когда маркер в векторной системе, экспрессирующей антитело или его функциональный фрагмент, является амплифицируемым, увеличение уровня ингибитора,

присутствующего в культуре клетки-хозяина, будет увеличивать количество копий маркерного гена. Поскольку амплифицированная область связана с геном антитела, продуцирование антитела также усиливается (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

[0257] После получения молекулы антитела путем рекомбинантной экспрессии она может быть очищена любым подходящим способом очистки молекулы иммуноглобулина, например, с помощью хроматографии (*например*, ионообменной, аффинной, в частности, аффинной в отношении конкретного антигена после белка А, и эксклюзионной колоночной хроматографии), центрифугирования, дифференциальной растворимости или любой другой стандартной методики очистки белков. Кроме того, заявленные антитела или их функциональные фрагменты могут быть слиты с гетерологичными полипептидными последовательностями, представленными в данном документе или иным образом известными в уровне техники для облегчения очистки. Например, заявленное антитело или его функциональный фрагмент можно очищать посредством рекомбинантного добавления полигистидиновой метки (His-метки), FLAG-метки, метки гемагглютинаина (HA-метки) или тус-метки, среди прочих, коммерчески доступных, и использования подходящих способов очистки.

Способы лечения

[0258] В другом аспекте в данном документе представлены способы применения антитела или его функционального фрагмента, раскрытых в данном документе, для подавления иммунной клетки *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В некоторых случаях иммунная клетка представляет собой Т-клетку, В-клетку, макрофаг или любую другую иммунную клетку. В некоторых случаях иммунная клетка представляет собой эффекторную Т-клетку. В некоторых случаях иммунные клетки представляют собой антигенспецифическую Т-клетку. В некоторых случаях способ, описанный в данном документе, применим для лечения нуждающегося в этом субъекта. В некоторых случаях способ включает введение антитела или его фрагмента, раскрытых в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых случаях способ включает подавление иммунной клетки *in vitro* и перенос иммунной клетки субъекту, нуждающемуся в этом.

[0259] В другом аспекте антитела по настоящему изобретению можно использовать в качестве нацеливающего средства для доставки другого терапевтического или цитотоксического средства (*например*, токсина) в клетку, экспрессирующую PD-1. Способ включает введение антитела к PD-1, связанного с терапевтическим или цитотоксическим средством, или в условиях, обеспечивающих связывание антитела с PD-1, экспрессируемым на клеточной поверхности.

[0260] В другом аспекте в данном документе представлены способы применения антитела или его функционального фрагмента, раскрытых в данном документе, для лечения заболеваний или состояний у нуждающегося в этом субъекта. В некоторых случаях заболевания или состояния при рассматриваемом способе применимы к связанным с передачей сигналов PD-1 или PD-L1. В некоторых случаях заболевания или состояния представляют собой воспалительное нарушение, аутоиммунные нарушения и/или связанные с избыточным или нежелательным иммунным ответом. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения воспалительного нарушения у млекопитающего, *например*, человека, нуждающегося в этом, включающий введение млекопитающему терапевтически эффективного количества антитела по настоящему изобретению. В некоторых случаях воспалительное нарушение представляет собой рассеянный склероз. В других случаях воспалительное нарушение представляет собой аутоиммунное заболевание. В некоторых случаях заболевание или состояние представляет собой болезнь Стилла, развившуюся у взрослых; алкогольный гепатит, алкогольный стеатогепатит, алкогольную болезнь печени, астму, включая астму, вызванную аллергенами, буллезную пемфигоидную (BP) астму, астму, вызванную неаллергенами, аллергии и аллергические состояния, такие как аллергический бронхолегочный аспергиллез, аллергический конъюнктивит, аллергический энцефаломиелит и аллергический неврит, пищевая аллергия, отторжение аллотрансплантата, алкогольный стеатогепатит (ASH), ANCA-ассоциированный васкулит, заболевание с образованием антител к базальной мембране клубочков (антител к GBM), антифосфолипидный синдром, афтозный стоматит, аппендицит, артрит, аутоиммунные заболевания, атрофический тиреоидит, аутоиммунную гемолитическую анемию (иммунную панцитопению, пароксизмальную ночную гемоглобинурию), аутоиммунные полиэндокринопатии, аутоиммунную тромбоцитопению (идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, иммуноопосредованную тромбоцитопению), аутоиммунный гепатит, пернициозную анемию (болезнь Аддисона) и аутоиммунные заболевания щитовидной железы, аутовоспалительные заболевания, аутосомно-доминантную поликистозную болезнь почек (ADPKD), анкилозирующий спондилит (AS), острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), болезнь или синдром Бехчета, воспаление, вызванное пчелиным укусом, синдром Блау, бурсит, пищевод Барретта, индуцированный блеомицином легочный фиброз, облитерирующий бронхиолит; гипертрофию сердца, глютенчувствительную энтеропатию (целиакию), воспаление, индуцированное химическими раздражителями, хориоретинит, хронический атипичный нейтрофильный дерматоз с липодистрофией и повышенной температурой (синдром

CANDLE), хроническую обструктивную болезнь легких (COPD), хронический панкреатит, хронический простатит, хронический рецидивирующий мультифокальный остеомиелит, рубцовую алопецию, колит, комплексный региональный болевой синдром, хроническую внутриспеченочную или внепеченочную холестатическую болезнь, конъюнктивит, болезнь соединительной ткани, ассоциированную с болезнью соединительной ткани интерстициальную болезнь легких (CTD-ILD), язву роговицы, ассоциированные с криопирином периодические синдромы, кожную красную волчанку (CLE), кистозный фиброз, дефицит антагониста рецептора интерлейкина-1 (DIRA), дефицит антагониста IL36R (DITRA), дерматит, диабетическую болезнь почек (DKD) (диабетическую нефропатию), дивертикулит, дискоидную красную волчанку, индуцированные лекарственными средствами кожные аллергические реакции замедленного типа, энцефалит, эзофагит, эозинофильные желудочно-кишечные нарушения (EGID), такие как эозинофильный эзофагит (EoE), эозинофильный гастроэнтерит, эозинофильный колит; семейную холодовую крапивницу, семейную средиземноморскую лихорадку, фистулизирующую болезнь Крона, гигантоклеточный артериит, гломерулонефрит, подагру, подагрический артрит, болезнь «трансплантат против хозяина» (GVHD), гранулематозный гепатит, синдром Гийена – Барре (GBS), болезнь Грейвса, тиреоидит Хашимото; пурпуру Хеноха – Шенлейна, гнойный гидраденит (HS), болезнь гиалиновых мембран, гиперактивную воспалительную реакцию, гиперэозинофильный синдром (HES), гипериммуноглобулинемию D с рецидивирующей лихорадкой (HIDS), пневмонит гиперчувствительности (HP), иммуноглобулиновые (IgA) нефропатии, связанную с IgG4 болезнь, иммунокомплексный нефрит, иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ITP), воспаление, воспаление ЦНС, воспалительное заболевание кишечника (IBD), воспалительное заболевание дыхательных путей (верхних или нижних), такое как воспалительное заболевания легких, бронхит, синусит, воспалительное ишемическое событие, такое как инсульт или остановка сердца, воспалительное заболевание печени, воспалительная миопатия, воспалительная нейропатия, воспалительная боль, воспаление, вызванное укусом насекомого, интерстициальный цистит, ирит, воспаление, вызванное раздражителем, ювенильный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, кератит, отторжение трансплантата почки, заболевание почек, фиброз почек, почечную недостаточность, дефицит лейкоцитарной адгезии, синдром Леффлера, волчанку, волчаночный нефрит (LN), фиброз печени, стеатоз печени; ишемию печени; нарушения липидов и липопротеина; синдром активации тучных клеток, мастоцитоз, менингит, микроскопический колит, смешанное заболевание соединительной ткани, склеродермию или варианты склеродермии, синдром Макла – Уэльса (крапивница-глухота-амилоидоз),

мукозит, миелит, миокардит, миозит, некротизирующий энтероколит, неонатальное воспалительное заболевание (NOMID), назальные полипы, неоваскулярную глаукому, неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), нерадиографический осевой спондилоартрит (nr-AxSpA) немукковисцидозный бронхоэктаз (ne-CFB), обструктивные или хронические воспалительные нарушения печени, глазную аллергию, неврит зрительного нерва, отторжение при пересадке органов, остеоартрит (OA), отит, панкреатит, панколит, воспалительное заболевание органов малого таза, обыкновенную пузырчатку (PV), буллезный пемфигоид (BP), перикардит, периодонтит, PFAPA (периодическую лихорадку, афтозный стоматит, фарингит, аденит), воспаление, вызванное растительным раздражителем, пневмоцистную инфекцию, пневмонию, пневмонит, воспаление, вызванное маслом сумача ядовитого/урушиола, нодозный полиартериит, полихондрит, поликистозную болезнь почек (PCKD), ревматическую полимиалгию, полимиозит, воспаление резервуара, проктит, проктосигмоидит, псориатический артрит (PsA), легочную артериальную гипертензию (PAH), фиброз легких, пиогенный стерильный артрит, зуд, реперфузионное повреждение и отторжение трансплантата, первичный билиарный цирроз (PBC), первичный склерозирующий холангит (PSC), синдром Рейно, болезнь Рейтера, реактивный артрит, отторжение почечного трансплантата, реперфузионное повреждение, ревматический кардит, ревматические заболевания, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит (РА), ринит, псориатический ринит, саркоидоз, синдром Шницлера, склерит, склероз, например, системный склероз (SSc), себорею, сепсис, септический шок, синдром Шегрена, воспалительные заболевания или состояния кожи, такие как акне, круговая алопеция, atopический дерматит, розацеа, экзема, дерматит, эндотоксикозный дерматит, дерматомиозит, стазисный дерматит, синдром Стивенса – Джонсона (SJS), раздражение кожи, кожная сыпь, сенсбилизация кожи (контактный дерматит или аллергический контактный дерматит), склеродермию, псориаз, псориаз обыкновенный, псориатический артрит; спинальный стеноз, спондилоартропатии, воспаление синовиальной оболочки, синдром системного воспалительного ответа (SIRS), системную красную волчанку (SLE), системную болезнь тучных клеток (SMCD), системный васкулит, ювенильный идиопатический артрит с системным началом, височный артериит, тендинит, тендосиновит, тироидит, отторжение при трансплантации, тубулоинтерстициальный нефрит, тубулярную дисфункцию, артериит Такаясу, токсический эпидермальный некролиз, крапивницу, фибромиому матки, увеит, увеоретинит, васкулит, васкулит (NHLBI), витилиго или гранулематоз Вегенера. В некоторых случаях заболевание или состояние представляет собой акне, кислотно-индуцированное повреждение легких,

болезнь Аддисона, гиперплазию надпочечников, адренкортикальную недостаточность, возрастную макулярную дегенерацию, старение, алкогольную болезнь печени, болезнь Альцгеймера, стенокардия, ангиофиброму, ангидротическую эктодермальную дисплазию, асциты, аспергиллез, атеросклероз, атеросклеротические бляшки, амилоидоз, боковой амиотрофический склероз (ALS), ангионевротический отек, острый инфаркт миокарда; заболевания, опосредованные комплексом антиген-антитело, дефицит альфа-1-антитрипсина; боль в спине, инфекцию *Bacillus anthracis*, паралич Белла, бериллиоз, боль в костях, ожоги, буллезный пемфигоид, рак, синдром запястного канала, болезнь Кастлемана, катаболические нарушения, катаракту, аневризму головного мозга, осложнения при трансплантации органов, неоваскуляризацию роговичного трансплантата, криптококкоз, незлокачественное гиперпролиферативное нарушение; злокачественное гиперпролиферативное нарушение; гепатоклеточную карциному; аденому толстой кишки; полипоз; аденокарциному толстой кишки; рак молочной железы; аденокарциному поджелудочной железы, хроническую сердечную недостаточность, хроническое заболевание легких недоношенного, кардиометаболический синдром, сердечно-сосудистое заболевание, кожную Т-клеточную лимфому, диабетический макулярный отек, дислипидемию; эндометриоз, эндотоксемию, эозинофильную болезнь ЖКТ (EGID), эозинофильный эзофагит (ЕоЕ), эозинофильные пневмонии, эпикондилит, эпидермолиз буллезный, мультиформную эритему, эритробластопению, семейную амилоидотическую полинейропатию, задержка роста плода, фибромиалгию, глаукому, глиобластому, гломерулярную болезнь, заболевание кишечника, повреждения пластины роста, выпадение волос, опоясывающий и простой герпес, гипопластические и другие анемии, травму головы, гепатиты А, В, С, D и Е, герпес; головную боль, потерю слуха, заболевание сердца, гемангиому, гемофильные суставы, наследственный синдром периодической лихорадки, наследственные заболевания соединительной ткани, болезнь Ходжкина, болезнь Хантингтона, гипераммонемию, гиперкальциемию, гиперхолестеринемию, гемолитическую анемию, гепатит, эндопротезирование тазобедренного сустава, гипертрофированное образование костной ткани, гиперчувствительную пневмонию, наследственную непереносимость фруктозы, гипертонию, гиперурикемию, идиопатическую демиелинизирующую полинейропатию, инфекционные заболевания, включая вирусные заболевания, такие как СПИД (ВИЧ-инфекция), ихтиоз, пигментный дерматоз (IP, синдром Блоха – Сименса), идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, инфекционный мононуклеоз, ишемию/реперфузию, инсулинорезистентность, замену суставов, повреждение почек, вызванное паразитарными инфекциями, лептоспироз, склерозирующий лишай (LS), красный плоский лишай, миастенический синдром Ламберта

– Итона, болезнь Лайма, печеночную недостаточность, включая острую печеночную недостаточность, истощение мышц, мышечную дистрофию, синдром Марфана (MFS), менингиому, мезотелиому, синдром множественного повреждения органов, миастению гравис (MG), миелодиспластический синдром, метаболический синдром, рассеянный склероз, нефротический синдром, невропатологические заболевания, незаменимый модулятор ядерного фактора каппа-B (NEMO) синдром дефицита, ожирение, синдром Ослера – Вебера, несовершенный остеогенез, остеонекроз, остеопороз, врожденную пахионихию болезнь Паджета, болезнь Паджета кости, болезнь Паркинсона, периодическую лихорадку, коклюш, первичную легочную гипертензию, гангренозную пиодермию, пиогенную гранулему, ретролентальные фиброплазии, эндометриоз брюшины, узловатую почесуху, психосоциальные стрессовые заболевания, заболевание легких, легочную гипертензию, респираторный дистресс-синдром, заболевание почек, заболевание сетчатки, ретролентальную фиброплазию, отторжение почечного трансплантата, защиту почек от лекарственных средств, вызывающих синдром Фанкони, заболевания дыхательных путей, вызванные респираторно-синцитиальным вирусом, риносинусит; индуцированный излучением фиброз, саркоидоз, тяжелую боль, апноэ во сне, сколиоз, серповидно-клеточную анемию, спортивные травмы, растяжения и вывихи, солнечные ожоги, повреждение спинного мозга, синдром Сезари, индуцированное кремнием заболевание (силикоз), субарахноидальное кровоизлияние, туберкулез, ассоциированный с рецепторами фактора некроза опухоли (TNF) периодический синдром (TRAPS), тромбоз; травматическое повреждение головного мозга, трансплантацию ткани, осложнения от диабета 1 или 2 типа, токсоплазмоз, тромбоцитопению, трахому, рестеноз сосудов, индуцированное вентиляцией повреждение легких; болезнь Уиппла или 2,8-дигидроксиадениновую нефропатию.

[0261] Примеры заболеваний или состояний, которые может лечить заявленное антитело, включают без ограничения острый диссеминированный энцефаломиелит (ADEM), болезнь Аддисона, аллергию, алопецию, боковой амиотрофический склероз, ANCA-васкулит, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, астму (включая аллергическую астму), атопический дерматит, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунный полиэндокринный синдром, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, церебральную малярию, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, целиакию, болезнь Крона, синдром Кушинга, дерматомиозит, сахарный диабет 1 типа, эозинофильный гранулематоз с полиангиитом, болезнь «трансплантат против хозяина», болезнь Грейвса, синдром Гийена — Барре, тиреоидит Хашимото, гнойный гидраденит, IgG4-ассоциированное

заболевание, воспалительный фиброз (*например*, склеродермию, фиброз легких и цирроз), ювенильный артрит, болезнь Кавасаки, лейкоз, волчаночный нефрит, лимфому, лимфопролиферативные нарушения, рассеянный склероз, миастению гравис, миелому, нерадиографический аксиальный спондилоартрит (nr-AxSpA), нейромиелит зрительного нерва, остеоартрит, пузырчатку, полимиозит, первичный билиарный холангит, первичный склерозирующий холангит, псориаз, псориатический артрит, ревматоидный артрит, саркоидоз, синдром Шегрена, системную красную волчанку, системный склероз, артериит Такаясу, височный артериит, отторжение трансплантата, поперечный миелит, язвенный колит, увеит, васкулит, витилиго и болезнь Фогта — Коянаги — Харада. В некоторых случаях заболевание или состояние включает ревматоидный артрит. В некоторых случаях заболевание или состояние включает рассеянный склероз.

[0262] В некоторых случаях способ лечения заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включает введение субъекту терапевтически эффективного количества раскрытого в данном документе агонистического антитела, введение субъекту фармацевтической композиции, включающей терапевтически эффективное количество раскрытого в данном документе антитела или иммуноконъюгата и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное средство, при этом заболевание или состояние дополнительно включает инфекцию, эндотоксический шок, связанный с инфекцией, артрит, ревматоидный артрит, псориатический артрит, ювенильный идиопатический артрит (JIA) с системным началом, воспалительное заболевание кишечника (IBD), системную красную волчанку (SLE), системный склероз, астму, atopический дерматит, воспалительное заболевание тазовых органов, болезнь Альцгеймера, болезнь Крона, язвенный колит, синдром раздраженного кишечника, рассеянный склероз, анкилозирующий спондилит, дерматомиозит, увеит, болезнь Пейрони, целиакию, заболевание желчного пузыря, пилонидальную болезнь, перитонит, псориаз, васкулит, хирургические спайки, инсульт, диабет I типа, артрит Лайма, менингоэнцефалит, иммуноопосредованные воспалительные нарушения центральной и периферической нервной системы, аутоиммунные нарушения, панкреатит, хирургическую травму, болезнь «трансплантат против хозяина», отторжение трансплантата, заболевание сердца, резорбцию костной ткани, ожоги у пациентов, инфаркт миокарда, болезнь Паджета, остеопороз, сепсис, фиброз печени/легких, периодонтит, гипохлоргидию, солидные опухоли (почечноклеточную карциному), рак печени, множественную миелому, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, неврологические виды рака и В-клеточные злокачественные опухоли (*например*, болезнь Кастельмана, некоторые лимфомы, хронический лимфоцитарный лейкоз и множественную

миелому), волчаночный нефрит и остеоартрит. В некоторых случаях заболевание или состояние включает синдром Шегрена. В некоторых случаях заболевание или состояние включает воспалительное заболевание кишечника (IBD). В некоторых случаях заболевание или состояние включает системную красную волчанку (SLE). В некоторых случаях заболевание или состояние включает волчаночный нефрит (LN). В некоторых случаях заболевание или состояние включает васкулит, такой как связанный с антителами к цитоплазме нейтрофилов (ANCA) (ANCA)-васкулит. В некоторых случаях заболевание или состояние включает болезнь «трансплантат против хозяина» (GvHD). В некоторых случаях заболевание или состояние включает диабет 1 типа. В некоторых случаях заболевание или состояние включает синдром Бехчета. В некоторых случаях заболевание или состояние включает сепсис. В некоторых случаях заболевание или состояние включает остеоартрит (OA). В некоторых случаях заболевание или состояние включает системный склероз (SSc). В некоторых случаях заболевание или состояние включает дерматомиозит. В некоторых случаях заболевание или состояние включает псориатический артрит (PsA). В некоторых случаях заболевание или состояние включает связанное с IgG4 заболевание. В некоторых случаях заболевание или состояние включает нерадиографический осевой спондилоартрит (nr-AxSpA). В некоторых случаях заболевание или состояние включает полимиозит. В некоторых случаях заболевание или состояние включает артериит Такааясу.

[0263] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения рака у млекопитающего, нуждающегося в этом, включающий введение млекопитающему терапевтически эффективного количества антитела по настоящему изобретению. В некоторых случаях рак представляет собой гепатоцеллюлярную карциному. В других случаях рак представляет собой острый миелоидный лейкоз, рак вилочковой железы, головного мозга, легкого, плоскоклеточный рак, рак кожи, глаза, ретинобластому, внутриглазную меланому, ротовой полости и ротоглотки, мочевого пузыря, желудка, поджелудочной железы, мочевого пузыря, молочной железы, шейки матки, головы, шеи, почечный, почки, печени, яичника, предстательной железы, толстой и прямой кишки, пищевода, яичка, гинекологических органов, щитовидной железы, ЦНС, ПНС, связанный со СПИДом (*например*, лимфома и саркома Капоши) или индуцированный вирусом рак.

[0264] В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, представляет собой млекопитающее, такое как человек. В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, представляет собой человека. В других случаях млекопитающее представляет собой мышь, крысу, кошку, собаку, кролика, свинью, овцу, лошадь, крупный рогатый скот, козу, песчанку, хомячка, морскую свинку, обезьяну или любое другое

млекопитающее. Многие такие млекопитающие могут представлять собой субъекты, которые известны из уровня техники как доклинические модели для определенных заболеваний или нарушений, включая воспалительные заболевания, солидные опухоли и/или другие виды рака (*например*, Talmadge et al., 2007 Am. J. Pathol. 170:793; Kerbel, 2003 Canc. Biol. Therap. 2(4 Suppl 1):S134; Man et al., 2007 Canc. Met. Rev. 26:737; Cespedes et al., 2006 Clin. TransL Oncol. 8:318).

[0265] В другом аспекте в настоящем изобретении представлены способы применения антитела к PD-1 по настоящему изобретению для лечения заболеваний или состояний у млекопитающего в сочетании со вторым средством. Второе средство можно вводить вместе, до или после антитела. В некоторых вариантах осуществления второе средство представляет собой средство, которое служит для облегчения симптомов воспалительных состояний, описанных в данном документе. Противовоспалительные средства включают нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID) и кортикостероиды. NSAID включают без ограничения салицилаты, такие как ацетилсалициловая кислота; дифлунизал, салициловую кислоту и салсалат; производные пропионовой кислоты, такие как ибупрофен, напроксен, дексипрофен, декскетопрофен, флурбипрофен, оксапрозин, фенопрофен, локсопрофен и кетопрофен; производные уксусной кислоты, такие как индометацин, диклофенак, толметин, ацеклофенак, сулиндак, набуметон, этодолак и кеторолак; производные енолиевой кислоты, такие как пироксикам, лорноксикам, мелоксикам, изоксикам, теноксикам, фенилбутазон и дроксикам; производные антралиновой кислоты, такие как мефенамовая кислота, флуфенамовая кислота, меклофенамовая кислота и толфенамовая кислота; селективные ингибиторы COX-2, такие как целекоксиб, лумиракоксиб, рофекоксиб, эторикоксиб, валдекоксиб, фирококсиб и парекоксиб; сульфонанилиды, такие как нимесулид; и другие, такие как клониксин и ликофелон. Кортикостероиды включают без ограничения кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизон и преднизолон.

[0266] В некоторых вариантах осуществления второе средство представляет собой иммунодепрессант. Иммунодепрессанты, которые можно использовать в комбинации с заявленным антителом, включают без ограничения гидроксихлорохин, сульфасалазин, лефлуномид, этанерцепт, инфликсимаб, адалимумаб, D-пеницилламин, пероральное соединение золота, инъекционное соединение золота (внутримышечную инъекцию), миноциклин, тиомалат натрия золота, ауранофин, D-пеницилламин, лобензарит, буцилламин, актарит, циклофосфамид, азатиоприн, метотрексат, мизорибин, циклоспорин и такролимус.

[0267] В некоторых вариантах осуществления второе средство применимо для лечения и/или профилактики ревматоидного артрита. Неограничивающие примеры таких агентов включают в себя модифицирующие заболевание противоревматические препараты (DMARDS), такие как гидроксихлорохин, сульфасалазин, метотрексат и лефлуномид; ингибиторы TNF (*например*, этанерцепт, адалимумаб, инфликсимаб, голимумаб, цертолизумаб пегол), ингибитор костимуляторных Т-клеток (*например*, абатацепт), ингибиторы рецептора IL-6 (*например*, тоцилизумаб, сарилумаб), антитело к CD20 (*например*, ритуксимаб); и ингибиторы JAK (*например*, тофацитиниб, барицитиниб, упадацитиниб); НПВП, такие как ибупрофен, напроксен и диклофенак; ингибитор COX-2, такой как целекоксиб и эторикоксиб; стероиды и кортикостероиды, такие как преднизолон и кортизон; и биологические средства, известные для лечения и/или профилактики таких состояний, включая, например, этанерцепт (*например*, ENBREL), инфликсимаб (*например*, REMICADE), адалимумаб (*например*, HUMIRA), анакинру (*например*, KINARET), абатацепт (ORENCIA), ритуксимаб (*например*, RITUXAN), цертолизумаб (*например*, CIMZIA), голимумаб (*например*, SIMPONI) и тоцилизумаб (*например*, АСТЕМРА). В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению вводят с двумя дополнительными терапевтическими агентами, пригодными для лечения и/или профилактики ревматологического состояния. В некоторых вариантах осуществления средства, применимые для лечения и/или профилактики ревматологического заболевания, включают соединение по настоящему изобретению и два дополнительных терапевтических средства, такие как метотрексат + лефлуномид, метотрексат + сульфасалазин, метотрексат + циклоспорин, метотрексат + гидроксихлорохин и тройная терапия гидроксихлорохин + сульфасалазин + метотрексат, гидроксихлорохин + сульфасалазин + лефлуномид.

[0268] В некоторых вариантах осуществления второе средство применимо для лечения и/или профилактики системной красной волчанки (SLE) или волчаночного нефрита (LN). Неограничивающие примеры таких средств включают иммунодепрессанты, которые ингибируют активность иммунной системы, и средства, одобренные для лечения SLE, такие как гидроксихлорохин, стероиды и кортикостероиды (*например*, преднизон, метилпреднизолон), белимуаb, азатиоприн, метотрексат, циклофосфамид, микофенолат и микофенолата мофетил, циклоспорин, лефлуномид, воклоспорин, абатацепт, анифролумаб, ритуксимаб, НПВП, такие как напроксен натрия и ибупрофен, противомаларийные лекарственные средства, такие как гидроксихлорохин, ингибиторы кальциневрина и такролимус.

[0269] В некоторых вариантах осуществления второе средство применимо для лечения LN, например, преднизон + аналоги микофеноловой кислоты, преднизон + микофеноловая

кислота, преднизон натрия + циклофосфамид, преднизон + такролимус, преднизон + воклоспорин, преднизон + белимумаб + аналоги микофеноловой кислоты, преднизон + белимумаб + циклофосфамид, преднизон + ритуксимаб.

[0270] В некоторых вариантах осуществления второе средство применимо для лечения LN, например, преднизон + аналоги микофеноловой кислоты, преднизон + натриевая соль микофеноловой кислоты, преднизон + азатиоприн, преднизон + такролимус, преднизон + циклоспорин, преднизон + мизорибин.

[0271] В некоторых вариантах осуществления второе средство применимо для лечения и/или профилактики остеоартрита (ОА). Неограничивающие примеры таких агентов включают в себя нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), капсаицин для местного применения, внутрисуставные инъекции глюкокортикоидов, ацетаминофен, дулоксетин, трамадол и инъекционные кортикостероиды, такие как ацетат метилпреднизолона, ацетат триамцинолона, ацетат бетаметазона и фосфат бетаметазона натрия, гексацетонид триамцинолона и дексаметазон.

[0272] В некоторых вариантах осуществления второе средство применимо для лечения и/или профилактики гастроэнтерологического состояния, такого как язвенный колит (UC) или болезнь Крона (CD). Неограничивающие примеры таких средств включают в себя инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб, ведолизумаб, тофацитиниб, устекинумаб, натализумаб, месаламин, диазосвязанную 5-АСК, сульфасалазин, балсалазид, олсалазин, кортикостероиды, такие как будесонид, гидрокортизон, метилпреднизолон и преднизон; иммуносупрессанты или иммуномодуляторы, такие как азатиоприн и 6-меркаптопурин, циклоспорин и метотрексат.

[0273] В некоторых вариантах осуществления второе средство применимо для лечения и/или профилактики пульмонологического состояния, такого как идиопатический легочный фиброз (IPF) или интерстициальное заболевание легких (ILD). Неограничивающие примеры таких средств включают нитенданиб, пирфенидон, кортикостероиды, такие как преднизон, другие ревматологические лекарственные средства, включая микофенолат (*например*, CellCept®), азатиоприн (*например*, Imuran®), лефлуномид (*например*, ARAVA®), ритуксимаб (*например*, RITUXAN®), циклофосфамид (*например*, CYTOXAN®), такролимус (*например*, PROGRAF®), лекарства, снижающие кислотность желудка, такие как антагонисты H-2-рецепторов, или ингибиторы протонной помпы, такие как лансопразол (*например*, PREVACID®24HR), омепразол (*например*, Prilosec OTC) и пантопразол (*например*, PROTONIX®).

[0274] В некоторых вариантах осуществления второе средство применимо для лечения и/или профилактики гепатологического или нефрологического состояния, такого как

NAFLD, NASH, DKD или CKD. Неограничивающие примеры таких средств включают метформин, ингибитор натрий-глюкозного котранспортера-2 (SGLT2i), лекарственную терапию для контроля гликемии, ингибитор DPP-4, инсулин, сульфонилмочевину, TZD (тиазолидиндион), ингибитор альфа-глюкозидазы, ингибитор SGLT2 (*например*, эмпаглифлозин, канаглифлозин, дапаглифлоз), агонист рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1 RA) (*например*, ликсисенатид, лираглутид, семаглутид, эксенатид, альбиглутид, дулаглутид) ингибиторы DPP-4 (*например*, саксаглиптин, алоглиптин, ситаглиптин, линаглиптин), одно или более средств, используемых для лечения высокого кровяного давления, таких как ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (ACE) и блокаторы рецепторов ангиотензина 2 (ARB), средства, способствующие снижению массы, или для контроля уровня сахара в крови, лекарственные средства, снижающие уровень холестерина (*например*, статины), финеренон и средства для лечения сахарного диабета, такие как ингибиторы альфа-глюкозидазы (*например*, акарбоза, миглитол, воглибоза).

[0275] В некоторых вариантах осуществления второе средство применимо для лечения и/или профилактики дерматологического состояния, такого как атопический дерматит (AD). Неограничивающие примеры таких средств включают кортикостероиды местного применения (TCS) (*например*, дезонид, гидрокортизон, флуоцинолон, триамцинолон, дипропионат бетаметазона), местные ингибиторы кальциневрина (TCI) (*например*, такролимус, пимекролимус), противомикробные препараты и антисептики местного применения, циклоспорин, метотрексат, микофенолата мофетил, интерферон гамма, ингибитор фосфодиэстеразы 4 (PDE4), такой как крисаборол, ингибитор JAK (*например*, руксолитиниб, упадацитиниб, аброцитиниб), системные глюкокортикоиды (*например*, преднизон), дупилумаб и антитела к IL-13 (*например*, тралокинумаб).

[0276] Другие аспекты настоящего изобретения предусматривают применение раскрытых антител для обнаружения наличия PD-1 в биологических образцах. Количество обнаруженного PD-1 может коррелировать с уровнем экспрессии PD-1, который, в свою очередь, коррелирует со статусом активации иммунных клеток (*например*, активированных Т-клеток, В-клеток и моноцитов) у субъекта.

[0277] Конкретная доза раскрытого в данном документе антитела, подлежащего введению субъекту для лечения, может варьироваться в зависимости от конкретного выбранного антитела, режима введения доз, которому следуют, независимо от введения его в комбинации с другими средствами, времени введения, ткани, в которую его вводят, и физической системой доставки, которая его переносит. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят субъекту в пределах около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39,

40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 мг в неделю в течение цикла лечения.

[0278] В некоторых вариантах осуществления антитело вводят субъекту в количестве более 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 или 10 мг в день в среднем в течение цикла лечения. Например, антитело вводят субъекту в количестве от около 6 до 10 мг, от около 6,5 до 9,5 мг, от около 6,5 до 8,5 мг, от около 6,5 до 8 мг или от около 7 до 9 мг в день в среднем в течение цикла лечения.

[0279] В некоторых вариантах осуществления однократную дозу антитела вводят субъекту в диапазоне от около 0,01 мг/кг до 50 мг/кг, например, около, менее чем около или более около 0,01 мг/кг, 0,02 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,04 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,06 мг/кг, 0,07 мг/кг, 0,08 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 13 мг/кг, 14 мг/кг, 15 мг/кг, 16 мг/кг, 17 мг/кг, 18 мг/кг, 19 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг, 30 мг/кг, 35 мг/кг, 40 мг/кг, 45 мг/кг или 50 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления однократную дозу антитела вводят субъекту в диапазоне от около 0,01 мг/кг до 10 мг/кг, например, от 0,01 мг/кг до 0,1 мг/кг, от 0,01 мг/кг до 1 мг/кг, от 0,01 мг/кг до 0,5 мг/кг, от 0,05 мг/кг до 0,1 мг/кг, от 0,05 мг/кг до 0,5 мг/кг, от 0,05 мг/кг до 1 мг/кг, от 0,05 мг/кг до 5 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 0,5 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 1 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 5 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг, от 0,5 мг/кг до 1 мг/кг, от 0,5 мг/кг до 5 мг/кг, от 0,5 мг/кг до 10 мг/кг, от 1 мг/кг до 5 мг/кг, от 1 мг/кг до 10 мг/кг или от 5 мг/кг до 10 мг/кг. Доза антитела может составлять около, по меньшей мере около или не более около 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000 мг или мг/кг или любой диапазон, который можно получить из него. Предполагается, что дозировка в мг/кг относится к количеству антитела в мг на кг общей массы тела субъекта. Предполагается, что при введении пациенту многократных доз дозы могут варьироваться по количеству, или они могут быть одинаковыми.

[0280] В некоторых вариантах осуществления антитело вводят субъекту в диапазоне от около 0,01 мг/кг до 50 мг/кг в сутки, например, около, менее или более около 0,01 мг/кг, 0,02 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,04 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,06 мг/кг, 0,07 мг/кг, 0,08 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 13 мг/кг, 14 мг/кг, 15 мг/кг, 16 мг/кг, 17 мг/кг, 18 мг/кг, 19 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг, 30 мг/кг, 35 мг/кг, 40 мг/кг, 45 мг/кг или 50 мг/кг в сутки. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят субъекту в диапазоне от около 0,1 мг/кг до 400 мг/кг в

неделю, например, около, менее или более около 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,9 мг/кг, 1 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг, 15 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг, 30 мг/кг, 35 мг/кг, 40 мг/кг, 45 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг, 150 мг/кг, 200 мг/кг, 250 мг/кг, 300 мг/кг, 350 мг/кг или 400 мг/кг в неделю. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят субъекту в диапазоне от около 0,4 мг/кг до 1500 мг/кг в месяц, например, около, менее или более около 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг, 15 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг, 30 мг/кг, 35 мг/кг, 40 мг/кг, 45 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг, 150 мг/кг, 200 мг/кг, 250 мг/кг, 300 мг/кг, 350 мг/кг, 400 мг/кг, 450 мг/кг, 500 мг/кг, 550 мг/кг, 600 мг/кг, 650 мг/кг, 700 мг/кг, 750 мг/кг, 800 мг/кг, 850 мг/кг, 900 мг/кг, 950 мг/кг или 1000 мг/кг в месяц. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят субъекту в диапазоне от около 0,1 мг/м² до 200 мг/м² в неделю, например, около, менее чем или более чем около 1 мг/м², 5 мг/м², 10 мг/м², 15 мг/м², 20 мг/м², 25 мг/м², 30 мг/м², 35 мг/м², 40 мг/м², 45 мг/м², 50 мг/м², 55 мг/м², 60 мг/м², 65 мг/м², 70 мг/м², 75 мг/м², 100 мг/м², 125 мг/м², 150 мг/м², 175 мг/м² или 200 мг/м² в неделю. Целевая доза может быть введена в виде одной дозы. В качестве альтернативы, целевая доза может быть введена около или более чем около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 или больше дозами. Например, доза около 1 мг/кг в неделю может быть доставлена еженедельно в дозе около 1 мг/кг каждую неделю, около 2 мг/кг, вводимой каждые две недели, или около 4 мг/кг, вводимой каждые четыре недели в течение недели. Схема введения может быть повторена в соответствии с любым режимом, описанным в данном документе, включая любую схему введения, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят субъекту в диапазоне от около 0,1 мг/м² до 500 мг/м², например, около, менее чем около или более чем около 1 мг/м², 5 мг/м², 10 мг/м², 15 мг/м², 20 мг/м², 25 мг/м², 30 мг/м², 35 мг/м², 40 мг/м², 45 мг/м², 50 мг/м², 55 мг/м², 60 мг/м², 65 мг/м², 70 мг/м², 75 мг/м², 100 мг/м², 130 мг/м², 135 мг/м², 155 мг/м², 175 мг/м², 200 мг/м², 225 мг/м², 250 мг/м², 300 мг/м², 350 мг/м², 400 мг/м², 420 мг/м², 450 мг/м² или 500 мг/м².

Фармацевтические композиции

[0281] В другом аспекте в данном документе представлены фармацевтические композиции, содержащие антитело к PD-1 или его функциональный фрагмент, раскрытый в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное средство. Фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное средство могут включать без ограничения инертные твердые разбавители и наполнители, разбавители, стерильный водный раствор и различные органические растворители, усилители проницаемости, солубилизаторы и адьюванты. Эти композиции могут быть составлены в соответствии с

известными способами получения фармацевтически применимых композиций. Составы описаны в ряде источников, которые хорошо известны и доступны специалистам в данной области техники. Например, в *Remington's Pharmaceutical Science* (Martin E.W., Easton Pennsylvania, Mack Publishing Company, 19th ed., 1995) описаны составы, которые можно использовать в связи с настоящим изобретением.

[0282] Фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может, например, иметь форму, подходящую для перорального введения в виде таблетки, капсулы, пилюли, порошка, составов с замедленным высвобождением, раствора, суспензии, для парентеральной инъекции в виде стерильного раствора, суспензии или эмульсии, для местного введения в виде мази или крема или для ректального введения в виде суппозитория. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, при этом матрицы находятся в форме изделий, *например*, пленки или микрокапсулы. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтил-метакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3,773,919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ этил-L-глутамат, неразлагаемый этилен-винилацетат, сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и ацетата лейпролида) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляной кислоты. Некоторые составы с замедленным высвобождением позволяют высвободить молекулы в течение нескольких недель до нескольких месяцев или даже до нескольких лет. В некоторых вариантах осуществления заявленная фармацевтическая композиция высвобождает заявленное антитело, как описано в данном документе, в течение по меньшей мере нескольких недель, например, по меньшей мере 1 недели, 2 недель, 3 недель или 4 недель. В дополнительных вариантах осуществления заявленная фармацевтическая композиция высвобождает антитело субъекта, как описано в данном документе, в течение нескольких месяцев, например, в течение по меньшей мере 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев или 6 месяцев.

[0283] Фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может быть в виде стандартных лекарственных форм, подходящих для однократного введения точных доз. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать антитело или его функциональный фрагмент в качестве активного ингредиента и может включать традиционный фармацевтический носитель или вспомогательное средство. Кроме того, она может включать другие лекарственные или фармацевтические средства, носители, адъюванты и т. д.

[0284] Примеры форм парентерального введения включают растворы или суспензии активного полипептида и/или ПЭГ-модифицированного полипептида в стерильных водных растворах, например, водных растворах пропиленгликоля или декстрозы. Такие лекарственные формы могут быть надлежащим образом забуферены солями, такими как гистидин и/или фосфат, при желании.

[0285] Составы, подходящие для введения, включают, например, водные стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические средства и растворенные вещества, которые обеспечивают изотоничность состава с кровью предполагаемого реципиента; водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие средства и загустители.

[0286] Составы могут быть представлены в контейнерах с одной дозой или несколькими дозами, например, в герметично закрытых ампулах и флаконах, и могут храниться в сублимированном (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекций, непосредственно перед применением. Растворы и суспензии для немедленного введения могут быть получены из стерильного порошка, гранул, таблеток *и т. д.*

[0287] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция для инъекции, содержащая заявленное антитело или его функциональный фрагмент и фармацевтическое вспомогательное средство, подходящее для инъекции. Примеры компонентов и количества средств в таких композициях описаны в данном документе.

[0288] Формы, в которые могут быть заключены раскрываемые фармацевтические композиции для введения путем инъекции, включают водные или масляные суспензии или эмульсии с кунжутным маслом, кукурузным маслом, хлопковым маслом или арахисовым маслом, а также эликсиры, маннит, декстрозу или стерильный водный раствор и аналогичные фармацевтические среды-носители.

[0289] Водные растворы в солевом растворе можно использовать для инъекции. Также можно использовать этанол, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т. п. (и их подходящие смеси), производные циклодекстрина и растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, с помощью покрытия, такого как лецитин, для поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и применения поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тимеросалом и т. п.

[0290] Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения антитела по настоящему изобретению или его функционального фрагмента в требуемое количество в подходящем растворителе с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и другие ингредиенты. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций определенные желательные способы приготовления представляют собой методики вакуумной сушки и сублимационной сушки, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно стерильного отфильтрованного раствора.

[0291] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция для перорального введения, содержащая антитело по настоящему изобретению или его функциональный фрагмент и фармацевтическое вспомогательное средство, подходящее для перорального введения.

[0292] В некоторых вариантах осуществления предложена твердая фармацевтическая композиция для перорального введения, содержащая (i) эффективное количество антитела по настоящему изобретению или его функционального фрагмента; необязательно (ii) эффективное количество второго средства; и (iii) фармацевтическое вспомогательное средство, подходящее для перорального введения. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит (iv) эффективное количество третьего средства.

[0293] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой жидкую фармацевтическую композицию, подходящую для перорального употребления. Фармацевтические композиции, подходящие для перорального введения, могут быть представлены в виде дискретных лекарственных форм, таких как капсулы, саше или таблетки, или жидкости, или аэрозольные распылители, каждая из которых содержит заданное количество активного ингредиента в виде порошка или в гранулах, раствор или суспензию в водной или неводной жидкости, эмульсии типа «масло в воде» или жидкой эмульсии типа «вода в масле». Такие лекарственные формы могут быть получены любым из способов фармации и, как правило, включают этап приведения активного ингредиента в связь с носителем, который составляет один или более необходимых ингредиентов. В целом, составы получают посредством непрерывного и равномерного смешивания активного ингредиента с жидкими носителями, или мелкодисперсными твердыми носителями, или обоими типами носителей и при необходимости последующего придания продукту нужной формы.

[0294] Кроме того, настоящее изобретение охватывает безводные фармацевтические композиции и лекарственные формы, содержащие активный ингредиент, поскольку вода может способствовать разложению некоторых полипептидов. Например, можно добавлять воду (*например, 5%*) в фармацевтической области как средство имитации длительного хранения для определения характеристик, таких как срок хранения или стабильность составов с течением времени. Безводные фармацевтические композиции и лекарственные формы, представленные в данном документе, могут быть получены с использованием безводных ингредиентов или ингредиентов с низким содержанием влаги и в условиях с низким содержанием влаги или низкой влажностью. Фармацевтические композиции и лекарственные формы, содержащие лактозу, могут быть выполнены безводными, если ожидается существенный контакт с влагой и/или влажностью во время изготовления, упаковки и/или хранения. Безводную фармацевтическую композицию можно готовить и хранить таким образом, чтобы сохранялась ее безводная природа. Соответственно, безводные композиции могут быть упакованы с использованием материалов, которые, как известно, предотвращают воздействие воды, так что они могут быть включены в подходящие наборы рецептур. Примеры подходящей упаковки включают без ограничения герметично запечатанные фольгу, пластмассу и т. п., контейнеры с разовой дозой, блистерные упаковки и контурные пакеты.

[0295] Антитело по настоящему изобретению можно комбинировать в однородной смеси с фармацевтическим носителем в соответствии с традиционными методиками получения фармацевтического состава. Носитель может иметь широкий спектр форм в зависимости от желаемой для введения формы препарата. При получении композиций для пероральной лекарственной формы можно использовать любую из обычных фармацевтических сред в качестве носителей таких как, например, вода, гликоли, масла, спирты, ароматизирующие средства, консерванты, красители и т. п., в случае пероральных жидких препаратов (таких как суспензии, растворы и эликсиры) или аэрозолей; или носители, такие как крахмалы, сахара, микрокристаллическая целлюлоза, разбавители, гранулирующие средства, смазывающие вещества, связующие вещества и разрыхлители, могут использоваться в случае пероральных твердых препаратов в некоторых вариантах осуществления без применения лактозы. Например, подходящие носители включают порошки, капсулы и таблетки с твердыми пероральными препаратами. При необходимости на таблетки можно наносить покрытие с помощью стандартных водных или безводных методик.

[0296] Связующие вещества, подходящие для применения в фармацевтических композициях и лекарственных формах, включают без ограничения кукурузный крахмал, картофельный крахмал или другие крахмалы, желатин, натуральные и синтетические

камеди, такие как акациевая камедь, альгинат натрия, альгиновая кислота, другие альгинаты, порошкообразный трагакант, гуаровая камедь, целлюлозу и ее производные (*например*, этилцеллюлозу, ацетат целлюлозы, карбоксиметилцеллюлозу кальция, карбоксиметилцеллюлозу натрия), поливинилпирролидон, метилцеллюлозу, предварительно клейстеризованный крахмал, гидроксипропилметилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу и их смеси.

[0297] Примеры подходящих наполнителей для применения в фармацевтических композициях и лекарственных формах включают без ограничения тальк, карбонат кальция (*например*, гранулы или порошок), микрокристаллическую целлюлозу, порошкообразную целлюлозу, декстраты, каолин, маннит, кремниевую кислоту, сорбит, крахмал, предварительно клейстеризованный крахмал и их смеси.

[0298] Разрыхлители можно использовать в композициях для получения таблеток, которые разрушаются при воздействии водной среды. Слишком большое количество разрыхлителя может давать таблетки, которые могут распадаться в бутылке. Слишком малое количество может быть недостаточным для распада и, таким образом, может изменять скорость и степень высвобождения активного(ых) ингредиента(ов) из лекарственной формы. Таким образом, достаточное количество разрыхлителя, которое не является ни слишком малым, ни слишком большим, чтобы отрицательно изменить высвобождение активного(ых) ингредиента(ов), можно использовать для формирования лекарственных форм. Количество используемого разрыхлителя может варьироваться в зависимости от типа состава и способа введения и может быть легко различимым для специалистов в данной области техники. В фармацевтической композиции можно использовать от около 0,5 до около 15 массовых процентов разрыхлителя или от около 1 до около 5 массовых процентов разрыхлителя. Разрыхлители, которые можно использовать для формирования фармацевтических композиций и лекарственных форм, включают без ограничений агар-агар, альгиновую кислоту, карбонат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, кроскармеллозу натрия, кросповидон, полакрилин калия, натрия крахмалгликолят, картофельный или тапиоковый крахмал, другие крахмалы, предварительно клейстеризованный крахмал, другие крахмалы, глины, другие альгины, другие целлюлозы, камеди или их смеси.

[0299] Смазывающие вещества, которые можно использовать для формирования фармацевтических композиций и лекарственных форм, включают без ограничения стеарат кальция, стеарат магния, минеральное масло, светло-минеральное масло, глицерин, сорбит, маннит, полиэтиленгликоль, другие гликоли, стеариновую кислоту, лаурилсульфат натрия, тальк, гидрогенизированное растительное масло (*например*, арахисовое масло, хлопковое масло, подсолнечное масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое

масло), стеарат цинка, этилолеат, этиллаурат, агар или их смеси. Дополнительные смазывающие вещества включают, например, силикоидный силикагель, коагулированный аэрозоль синтетического диоксида кремния или их смеси. Смазывающее вещество может быть необязательно добавлено в количестве менее чем около 1 массовый процент фармацевтической композиции.

[0300] Если для перорального введения желательны водные суспензии и/или эликсиры, активный ингредиент может быть объединен с различными подсластителями или ароматизаторами, красящим веществом или красителями и, если это желательно, эмульгирующими и/или суспендирующими средствами вместе с такими разбавителями, как вода, этанол, пропиленгликоль, глицерин и различные их комбинации.

[0301] Таблетки могут не иметь покрытия, или на них известными методиками может быть нанесено покрытие, замедляющее распад и всасывание в желудочно-кишечном тракте, что таким образом обеспечивает устойчивое действие в течение более длительного периода. Например, может быть использован замедляющий высвобождение материал, такой как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат. Составы для перорального применения также могут быть представлены в виде твердых желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем, например, фосфатом кальция или каолином, или в виде мягких желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с водой или масляной средой, такой как арахисовое масло, жидкий парафин или оливковое масло.

[0302] Поверхностно-активное вещество, которое можно использовать для формирования фармацевтических композиций и лекарственных форм, включает без ограничения, гидрофильные поверхностно-активные вещества, липофильные поверхностно-активные вещества и их смеси. Таким образом, можно использовать смесь гидрофильных поверхностно-активных веществ, можно использовать смесь липофильных поверхностно-активных веществ или смесь по меньшей мере одного гидрофильного поверхностно-активного вещества и по меньшей мере одного липофильного поверхностно-активного вещества.

[0303] Поверхностно-активные вещества с более низкими значениями HLB являются более липофильными или гидрофобными и имеют большую растворимость в маслах, тогда как поверхностно-активные вещества с более высокими значениями HLB являются более гидрофильными и имеют большую растворимость в водных растворах. Гидрофильные поверхностно-активные вещества обычно считаются такими, которые имеют значение HLB более около 10, а также анионные, катионные или цвиттерионные соединения, для которых шкала HLB обычно не применима. Аналогичным образом, липофильные (*m. e.*

гидрофобные) поверхностно-активные вещества представляют собой соединения, имеющие значение HLB, равное или менее около 10. Однако значение HLB поверхностно-активного вещества является просто грубым указателем, обычно используемым для обеспечения состава промышленных, фармацевтических и косметических эмульсий.

[0304] Гидрофильные поверхностно-активные вещества могут быть либо ионными, либо неионными. Подходящие ионные поверхностно-активные вещества включают без ограничения алкиламмониевые соли; соли фузидовой кислоты; производные жирных кислот аминокислот, олигопептидов и полипептидов; производные глицеридов аминокислот, олигопептидов и полипептидов; лецитины и гидрогенизированные лецитины; лизолецитины и гидрогенизированные лизолецитины; фосфолипиды и их производные; лизофосфолипиды и их производные; соли сложного эфира жирных кислот и карнитина; соли алкилсульфатов; соли жирных кислот; докузат натрия; ациллактаты; сложные моно- и диацетилированные эфиры винной кислоты моно- и диглицеридов; сукцинированные моно- и диглицериды; сложные эфиры лимонной кислоты моно- и диглицеридов; и их смеси.

[0305] В вышеупомянутой группе ионные поверхностно-активные вещества включают, например, лецитины, лизолецитин, фосфолипиды, лизофосфолипиды и их производные; соли сложного эфира жирных кислот и карнитина; соли алкилсульфатов; соли жирных кислот; докузат натрия; ациллактаты; сложные моно- и диацетилированные эфиры винной кислоты моно- и диглицеридов; сукцинированные моно- и диглицериды; сложные эфиры лимонной кислоты моно- и диглицеридов; и их смеси.

[0306] Ионные поверхностно-активные вещества могут представлять собой ионизированные формы лецитина, лизолецитина, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерина, фосфатидиновой кислоты, фосфатидилсерина, лизофосфатидилхолина, лизофосфатидилэтаноламина, лизофосфатидилглицерина, лизофосфатидной кислоты, лизофосфатидилсерина, ПЭГ-фосфатидилэтаноламина, PVP-фосфатидилэтаноламина, сложных лактиловых эфиров жирных кислот, стеароил-2-лактата, стеароиллактата, сукцинированных моноглицеридов, моно/диацетилированных эфиров винной кислоты моно/диглицеридов, сложных эфиров лимонной кислоты моно/диглицеридов, холилсаркозина, капроата, каприлата, капрата, лаурата, мирилата, пальмитата, олеата, рицинолеата, линолеата, линолената, стеарата, лаурилсульфата, терацилсульфата, докузата, лауроилкарнитинов, пальмитоилкарнитинов, миристоилкарнитинов их соли и смесей.

[0307] Гидрофильные неионные поверхностно-активные вещества могут включать без ограничения алкилглюкозиды, алкилмальтозиды, алкилтиоглюкозиды,

лаурилмакроголглицериды; полиоксиалкиленалкиловые эфиры, такие как алкиловые эфиры полиэтиленгликоля; полиоксиалкиленалкилфенолы, такие как полиэтиленгликоль-алкилфенолы; сложные эфиры полиоксиалкиленалкилфенола и жирных кислот, такие как сложные полиэтиленгликолевые моноэфиры и жирных кислот и сложные полиэтиленгликолевые диэфиры жирных кислот; сложные полиэтиленгликолевые эфиры глицерина и жирных кислот; сложные эфиры полиглицерина и жирных кислот; сложные эфиры полиоксиалкиленсорбитана и жирных кислот, такие как сложные полиэтиленгликолевые эфиры сорбитана и жирных кислот; продукты гидрофильной переэтерификации полиола с по меньшей мере одним членом группы, состоящей из глицеридов, растительных масел, гидрогенизированных растительных масел, жирных кислот и стерола; полиоксиэтиленстеролы, производные и их аналоги; полиоксиэтилированные витамины и их производные блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена; и их смесей; сложные полиэтиленгликолевые эфиры сорбитана и гидрофильные продукты переэтерификации полиола с по меньшей мере одним членом группы, состоящей из триглицеридов, растительных масел и гидрогенизированных растительных масел. Полиол может представлять собой глицерин, этиленгликоль, полиэтиленгликоль, сорбит, пропиленгликоль, пентаэритрит или сахарид.

[0308] Другие гидрофильные неионогенные поверхностно-активные вещества включают без ограничения ПЭГ-10 лаурат, ПЭГ-12 лаурат, ПЭГ-20 лаурат, ПЭГ-32 лаурат, ПЭГ-32 дилаурат, ПЭГ-12 олеат, ПЭГ-15 олеат, ПЭГ-20 олеат, ПЭГ-20 диолеат, ПЭГ-32 олеат, ПЭГ-200 олеат, ПЭГ-400 олеат, ПЭГ-15 стеарат, ПЭГ-32 дистеарат, ПЭГ-40 стеарат, ПЭГ-100 стеарат, ПЭГ-20 дилаурат, ПЭГ-25 глицерил триолеат, ПЭГ-32 диолеат, ПЭГ-20 глицерил лаурат, ПЭГ-30 глицерил лаурат, ПЭГ-20 глицерил стеарат, ПЭГ-20 глицерил олеат, ПЭГ-30 глицерил олеат, ПЭГ-30 глицерил лаурат, ПЭГ-40 глицерил лаурат, ПЭГ-40 пальмоядровое масло, ПЭГ-50 гидрогенизированное касторовое масло, ПЭГ-40 касторовое масло, ПЭГ-35 касторовое масло, ПЭГ-60 касторовое масло, ПЭГ-40 гидрогенизированное касторовое масло, ПЭГ-60 гидрогенизированное касторовое масло, ПЭГ-60 кукурузное масло, ПЭГ-6 капрат/каприлат глицериды, ПЭГ-8 капрат/каприлат глицериды, полиглицерил-10 лаурат, ПЭГ-30 холестерин, ПЭГ-25 фитостерин, ПЭГ-30 соевый стерин, ПЭГ-20 триолеат, ПЭГ-40 сорбитан олеат, ПЭГ-80 сорбитан лаурат, полисорбат 20, полисорбат 80, ПОЭ-9 лауриловый эфир, РОЕ-23 лауриловый эфир, РОЕ-10 олеиловый эфир, РОЕ-20 олеиловый эфир, РОЕ-20 стеариловый эфир, токоферил ПЭГ-100 сукцинат, ПЭГ-24 холестерин, полиглицерил-10олеат, Tween 40, Tween 60, моностеарат сахарозы, монолаурат сахарозы, монопальмитат сахарозы, ПЭГ 10-100 нонилфенольный ряд, ПЭГ 15-100 октилфенольный ряд и полуксамеры.

[0309] Подходящие липофильные поверхностно-активные вещества включают, исключительно в качестве примера, жирные спирты; сложные эфиры глицерина и жирных кислот; ацелированные эфиры глицерина и жирных кислот; сложные эфиры низшего спирта и жирных кислот; сложные пропиленгликолевые эфиры жирных кислот; сложные эфиры сорбитана и жирных кислот; сложные полиэтиленгликолевые эфиры жирных кислот; стеролы и производные стеролов; полиоксиэтилированные стеролы и производные стеролов; алкиловые эфиры полиэтиленгликоля; сложные эфиры сахаров; эфиры сахаров; производные молочной кислоты и моно- и диглицеридов; гидрофобные продукты переэтерификации полиола с по меньшей мере одним членом группы, состоящей из глицеридов, растительных масел, гидрогенизированных растительных масел, жирных кислот и стеролов; маслорастворимые витамины/производные витаминов; и их смеси. В этой группе иллюстративные липофильные поверхностно-активные вещества включают сложные эфиры глицерина и жирных кислот, сложные пропиленгликолевые эфиры жирных кислот и их смеси, или представляют собой гидрофобные продукты переэтерификации полиола с по меньшей мере одним членом группы, состоящей из растительных масел, гидрогенизированных растительных масел и триглицеридов.

[0310] В некоторых случаях композиция содержит солюбилизатор для обеспечения хорошей солюбилизации и/или растворения соединения и сведения к минимуму осаждения соединения. Это может быть особенным преимуществом для композиций для неперорального применения, *например*, композиции для инъекции. Также можно добавлять солюбилизатор для повышения растворимости гидрофильного лекарственного средства и/или других компонентов, таких как поверхностно-активные вещества, или для поддержания композиции в виде стабильного или гомогенного раствора или дисперсии.

[0311] Примеры подходящих солюбилизаторов включают без ограничения следующие: спирты и полиолы, такие как этанол, изопропанол, бутанол, бензиловый спирт, этиленгликоль, пропиленгликоль, бутандиолы и их изомеры, глицерин, пентаэритрит, сорбит, маннит, транскутол, диметилизосорбид, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, поливиниловый спирт, гидроксипропилметилцеллюлоза и другие производные целлюлозы, циклодекстрины и производные циклодекстрина; эфиры полиэтиленгликолей, имеющих среднюю молекулярную массу от около 200 до около 6000, например, эфир тетрагидрофурурилового спирта и ПЭГ (гликофуrol) или метокси-ПЭГ; амиды и другие азотсодержащие соединения, такие как 2-пирролидон, 2-пиперидон, ϵ -капролактam, N-алкилпирролидон, N-гидроксиалкилпирролидон, N-алкилпиперидон, N-алкилкапролактam, диметилацетамид и поливинилпирролидон; сложные эфиры, такие как этилпропионат, трибутилцитрат, ацетилтриэтилцитрат, ацетилтрибутилцитрат,

триэтилцитрат, этилолеат, этилкаприлат, этилбутират, триацетин, пропиленгликоля моноацетат, пропиленгликоля диацетат, ϵ -капролактон и их изомеры, δ -валеролактон и их изомеры, β -бутиролактон и их изомеры; и другие солюбилизаторы, известные в уровне техники, такие как диметилацетамид, диметилизосорбид, N-метилпирролидоны, монооктаноин, моноэтиловый эфир диэтиленгликоля, и воду.

[0312] Также можно использовать смеси солюбилизаторов. Примеры включают без ограничения триацетин, триэтилцитрат, этилолеат, этилкаприлат, диметилацетамид, N-метилпирролидон, N-гидроксиэтилпирролидон, поливинилпирролидон, гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксипропилциклодекстрины, этанол, полиэтиленгликоль 200–100, гликофуrol, транскутол, пропиленгликоль и диметилизосорбид. Примеры солюбилизаторов включают сорбит, глицерин, триацетин, этиловый спирт, ПЭГ-400, гликофуrol и пропиленгликоль.

[0313] Количество солюбилизатора, которое может быть включено, не имеет конкретных ограничений. Количество данного солюбилизатора может быть ограничено биоприемлемым количеством, которое может быть легко определено специалистом в данной области. В некоторых случаях может быть выгодно включать количества солюбилизаторов, намного превышающие биоприемлемые количества, например, для максимизации концентрации лекарственного средства, при этом избыток солюбилизатора удаляется перед обеспечением композиции субъекту с использованием традиционных методик, таких как дистилляция или выпаривание. Таким образом, при наличии, солюбилизатор может иметь массовое соотношение 10%, 25%, 50%, 100% или до около 200% по массе в расчете на общую массу лекарственного средства и других вспомогательных средств. При желании также можно использовать очень небольшие количества солюбилизатора, например, 5%, 2%, 1% или даже меньше. Как правило, солюбилизатор может присутствовать в количестве от около 1% до около 100%, более типично от около 5% до около 25% по массе.

[0314] Композиция может дополнительно включать одну или более фармацевтически приемлемых добавок и вспомогательных средств. Такие добавки и вспомогательные средства включают без ограничения усилители липкости, противовспенивающие средства, буферные средства, полимеры, антиоксиданты, консерванты, хелатирующие средства, модуляторы вязкости, регуляторы тоничности, ароматизаторы, красители, отдушки, замутнители, суспендирующие средства, связующие вещества, наполнители, пластификаторы, смазывающие вещества и их смеси.

[0315] Кроме того, в композицию могут быть включены кислота или основание для облегчения обработки, повышения стабильности или для других целей. Примеры

фармацевтически приемлемых оснований включают аминокислоты, сложные эфиры аминокислот, гидроксид аммония, гидроксид калия, гидроксид натрия, гидрокарбонат натрия, гидроксид алюминия, карбонат кальция, гидроксид магния, силикат магния алюминия, синтетический алюмосиликат, синтетический гидрокальцит, гидроксид магния алюминия, диизопропилэтиламин, этаноламин, этилендиамин, триэтаноламин, триэтиламин, триизопропаноламин, триметиламин, трис(гидроксиметил)аминометан (TRIS) и т. п. Также подходят основания, которые представляют собой соли фармацевтически приемлемой кислоты, такой как уксусная кислота, акриловая кислота, адипиновая кислота, альгиновая кислота, алкансульфоновая кислота, аминокислоты, аскорбиновая кислота, бензойная кислота, борная кислота, масляная кислота, карбоновая кислота, лимонная кислота, жирные кислоты, муравьиная кислота, фумаровая кислота, глюконовая кислота, гидрохиносульфоновая кислота, изоаскорбиновая кислота, молочная кислота, малеиновая кислота, щавелевая кислота, пара-бромфенилсульфоновая кислота, пропионовая кислота, п-толуолсульфоновая кислота, салициловая кислота, стеариновая кислота, янтарная кислота, дубильная кислота, винная кислота, тиогликолевая кислота, толуолсульфоновая кислота, мочева кислота и т. п. Также можно использовать соли полипротонных кислот, такие как фосфат натрия, гидрофосфат натрия и дигидрофосфат натрия. Когда основание представляет собой соль, катион может быть любым удобным и фармацевтически приемлемым катионом, таким как аммоний, щелочные металлы, щелочноземельные металлы и т. п. Пример может включать без ограничения натрий, калий, литий, магний, кальций и аммоний.

[0316] Подходящие кислоты представляют собой фармацевтически приемлемые органические или неорганические кислоты. Примеры подходящих неорганических кислот включают соляную кислоту, бромистоводородную кислоту, йодистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, борную кислоту, фосфорную кислоту и т. п. Примеры подходящих органических кислот включают уксусную кислоту, акриловую кислоту, адипиновую кислоту, альгиновую кислоту, алкансульфоновые кислоты, аминокислоты, аскорбиновую кислоту, бензойную кислоту, борную кислоту, масляную кислоту, карбоновую кислоту, лимонную кислоту, жирные кислоты, муравьиную кислоту, фумаровую кислоту, глюконовую кислоту, гидрохиносульфоновую кислоту, изоаскорбиновую кислоту, молочную кислоту, малеиновую кислоту, метансульфоновую кислоту, щавелевую кислоту, пара-бромфенилсульфоновую кислоту, пропионовую кислоту, п-толуолсульфоновую кислоту, салициловую кислоту, стеариновую кислоту, янтарную кислоту, дубильную кислоту, винную кислоту, тиогликолевую кислоту, толуолсульфоновую кислоту, мочева кислоту и т. п.

[0317] В другом аспекте настоящего изобретения представлены наборы, содержащие единичные дозы, содержащие композиции антител по настоящему изобретению, и инструкции по применению. Набор может дополнительно содержать одну или более единичных доз, содержащих один или более дополнительных реагентов, таких как иммуносупрессивный реагент, как описано выше, или одно или более дополнительных антител, как описано в данном документе (*например*, антитело человека, имеющее комплементарную активность, которое связывается с эпитопом в антигене, отличном от антигена первого антитела человека). Наборы, как правило, содержат этикетку, указывающую предполагаемое применение содержимого набора. Термин «этикетка» включает в себя любой письменный или записанный материал, поставляемый вместе с набором или иным образом сопровождающий набор.

[0318] Набор по настоящему изобретению также может включать диагностические средства и/или другие терапевтические средства. В некоторых случаях набор включает антитело по настоящему изобретению и диагностическое средство, которое можно использовать в способе диагностики состояния или наличия заболевания, состояния или нарушения у субъекта, как описано в данном документе.

Медицинское применение

[0319] В другом аспекте в данном документе предложены антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или иммуноконъюгат по настоящему изобретению, фармацевтическая композиция, содержащая антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или иммуноконъюгат по настоящему изобретению, для применения в терапии. Соответственно, в данном документе предложены антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или иммуноконъюгат, или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или иммуноконъюгат по настоящему изобретению, для применения в способе лечения, как описано в данном документе.

[0320] В другом аспекте в данном документе предложено применение антитела, или антигенсвязывающего фрагмента, или иммуноконъюгата по настоящему изобретению, или фармацевтической композиции, содержащей антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или иммуноконъюгат согласно настоящему изобретению, в производстве лекарственного препарата для применения в терапии, например, для применения в способе лечения, как описано в данном документе.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO: 1, CDRH1, молекулярный тип: белок, организм: синтетический конструкт
TYPIE

SEQ ID NO: 2, CDRH2, молекулярный тип: белок, организм: синтетический конструкт

NFHPYNDDTKYNEKFQG

SEQ ID NO: 3, CDRH3, молекулярный тип: белок, организм: синтетический конструкт
ENYGSHGGFVY

SEQ ID NO: 4, CDRL1, молекулярный тип: белок, организм: синтетический конструкт
RASSSVISSYLH

SEQ ID NO: 5, CDRL2, молекулярный тип: белок, организм: синтетический конструкт
STSNLAS

SEQ ID NO: 6, CDRL3, молекулярный тип: белок, организм: синтетический конструкт
QQYNSYPLT

SEQ ID NO: 17, Fc IgG1 человека с мутацией P238D, молекулярный тип: белок, организм:
синтетический конструкт

THTCPPCPAPPELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 18, тяжелая цепь, молекулярный тип: белок, организм: синтетический
конструкт

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAFGYTFTTYPIEWMRQAPGKGLEWIGNFHHPYNDDT
KYNEKFQGRVTLTVDKSSTTVYMELSSLRSEDVAVYYCARENYGSHGGFVYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
PELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 19, легкая цепь, молекулярный тип: белок, организм: синтетический конструкт
ENQLTQSPSSLSASVGRVTITCRASSSVISSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPS
RFGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ПРИМЕРЫ

[0321] Следующие примеры представлены для дополнительной иллюстрации некоторых вариантов осуществления настоящего описания, но не предназначены для ограничения

объема раскрытия; будет понятно, что в качестве альтернативы можно использовать другие процедуры, методологии или методики, известные специалистам в данной области техники.

Пример 1. Влияние взаимодействия Fc-рецептора на агонистическую функцию иллюстративного антитела к PD-1

[0322] Сигнальные эффекты иллюстративного агонистического антитела против PD-1 человека (IgG1 мыши клона 19, описанного в патенте США № 9,181,342, выданном 10 ноября 2015 г.) исследовали в анализе репортера, в котором экспрессирующая PD-1 Т-клетки Jurkat, продуцирующие люциферазу под контролем элемента ответа NFAT, культивировали с клетками BW5147, экспрессирующими конструкцию антитела к CD3 «стимуляторной Т-клетки» (TCS), как описано ранее (Leitner et al. 2010). Чтобы исследовать роль взаимодействия Fc рецептора в агонизме антитела, анализ проводили либо с клетками BW5147, экспрессирующими только конструкцию TCS, либо с клетками BW5147, также трансфицированными для экспрессии мышиного FcγR2B.

[0323] 5×10^4 репортерных клеток Jurkat (Promega, № по каталогу J1250b) добавляли лунку 96-луночного планшета с U-образным дном и культивировали с 5×10^4 клетками BW5147 плюс либо антитело к PD-1, либо изотипический контроль, в общем объеме 80 мкл буфера для анализа (RPMI 1640 + 1% FCS). Выполняли серию из 9 точечных разведений антител с разведениями 1 к 3, начиная с 200 нМ. Через 6 часов инкубации в увлажненном CO₂ в инкубаторе при 37 °C планшеты удаляли из инкубатора и уравнивали до комнатной температуры в течение 10 минут. Количество полученной люциферазы количественно определяли (в качестве меры активации Т-клеток) с использованием системы Bio-Glo™ Luciferase Assay System (Promega); в каждую лунку добавляли 80 мкл Bio-Glo™ Luciferase Assay Reagent и планшеты инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Люминесценцию количественно определяли с использованием CLARIOstar Plus (BMG Labtech).

[0324] При использовании стимуляторных клеток, экспрессирующих FcγR2B мыши, антитело к PD-1 клон 19 вызывало значительное снижение активации Т-клеток с IC50 0,13 нМ (**фигура 1А**). При использовании стимуляторных клеток, не экспрессирующих Fc-рецептор, клон 19 не влиял на активацию Т-клеток (**фигура 1В**).

Пример 2. Гуманизация иллюстративного антитела к PD-1

[0325] Последовательности VH и VL клона 19 выравнивали по базе данных последовательностей зародышевой линии человека и выбирали гомологичные последовательности в качестве каркасов для гуманизации. IGHV1-24*01 или IGHV7-4-1*02

использовали в качестве каркасов для домена VH и IGKV1-39*01 или IGKV3-11*01 использовали в качестве каркасов для домена VL.

[0326] Последовательности VH и VL проводили через алгоритм прививки CDR для переноса CDR из мышиноного антитела клон 19 на выбранные последовательности зародышевой линии человека. Чтобы обеспечить гуманизацию с учетом структуры, конструировали модели для мышинных VH и VL клона 19 и применяли подход, основанный на учете структуры, для определения того, какие из каркасных аминокислот следует сохранить в рамке гуманизованного антитела для сохранения целостности связывания. В **таблица 1** приводятся созданные последовательности VH и VL.

[0327] Варианты антител получали, состоящими из всех потенциальных комбинаций гуманизованных доменов VH и VL. Варианты получали на изоците каппа IgG1 человека. Аффинность связывания и кинетику вариантов гуманизованных антител к PD-1 человека или яванского макака определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора Biacore 8K (Cytiva). Для покрытия сенсорного чипа Series S CM5 Sensor Chip (Cytiva) поликлональным антителом к IgG человека использовали набор для захвата антител человека (Cytiva). Затем антитело к PD-1 захватывали на поверхность биосенсора, а в референсном канале захватывали антитело изотипического контроля. Затем различные концентрации мономерного растворимого внеклеточного домена PD-1 человека или растворимого внеклеточного домена PD-1 яванского макака вводили по иммобилизованным антителам в буфере 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% об./об. поверхностно-активного вещества P20, pH 7,4 (HBS-P) при 37 °C, в анализе кинетики с одним циклом. Скорости ассоциации и диссоциации аппроксимировали с использованием программного обеспечения BiaEvaluation (Cytiva) после вычитания эталона и пустого образца и вычисляли константы диссоциации. В таблице 2 показано связывание K_D для каждого из гуманизованных вариантов PD-1 человека и яванского макака.

Таблица 1. Последовательности иллюстративных переменных областей агонистического антитела к PD-1

	Название	Каркас человека	Последовательность	SEQ ID NO	Молекулярный тип	Организм
Исходное	VH	—	QVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKAFGYTFT TYPIEWMKQNHGKSLEWIGNFHPYNDDTKY NEKFKGKAKLTVEKSSSTTVYLELSRLTSDDS AVYYCARENYGSHGGFVYWGQGLTVTVSG	7	Белки	Синтетический конструктор
Гуманизованный	hu-VH1	IGHV1-24*01	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAKAFGYTFT TYPIEWMRQAPGKGLEWIGNFHPYNDDTKY NEKFQGRVTLTVDKSSSTTVYMELSSLRSED AVYYCARENYGSHGGFVYWGQGLTVTVSS	8	Белки	Синтетический конструктор

Гуманизи- рованный	hu-VH2	IGHV1- 24*01	QVQL VQSGAEVKKPGASVKVSCA FGYTFT TYPEIWRQAPGKGLEWGMGNFHPY NDDTK YNEKFQGRVTMTVDKSTTTVYME LSSLRSE DTAVYYCARENYGSHGGFVYWGQ GTLVTV SS	9	Белки	Синте- тиче- ский конструк т
Гуманизи- рованный	hu-VH3	IGHV7-4- 1*02	QVQL VQSGSELKKPGASVKVSCA FGYTFT TYPEIWMRQAPGGGLEWIGNFHPY NDDTKY NEGFTGRFVLSVDKSSSTTVYLQ ISSLKAEDT AVYYCARENYGSHGGFVYWGQ GTLVTV SS	10	Белки	Синте- тиче- ский конструк т
Гуманизи- рованный	hu-VH4	IGHV7-4- 1*02	QVQL VQSGSELKKPGASVKVSCA FGYTFT TYPEIWRQAPGGGLEWGMGNFHPY NDDTK YNEGFTGRFVFSVDKSVTTVYLQ ISSLKAED TAVYYCARENYGSHGGFVYWGQ GTLVTV S	11	Белки	синте- тиче- ский конструк т
Исходное	VL	—	ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMT CRASSSVISS YLHWYQQKSGASPKLWIYSTSNL ASGVDPDR FSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAAT YYCQQYN SYPLTFGAGTKLEIK	12	Белки	синте- тиче- ский конструк т
Гуманизи- рованный	hu-VL1	IGKV1- 39*01	ENQLTQSPSSLASVGDRTIT CRASSSVISS YLHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNL ASGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT YYCQQYNS YPLTFGGGTKLEIK	13	Белки	синте- тиче- ский конструк т
Гуманизи- рованный	hu-VL2	IGKV1- 39*01	ENQLTQSPSSLASVGDRTIT CRASSSVISS YLHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNL ASGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT YYCQQYRG YPLTFGGGTKLEIK	14	Белки	синте- тиче- ский конструк т
Гуманизи- рованный	hu-VL3	IGKV3- 11*01	ENVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASSSVISS YLHWYQQKPGQAPRLLIYSTSNL ASGIPARF SGSGSGTDYTLTISSLEPEDFA VYYCQQYNS YPLTFGGGTKLEIK	15	Белки	синте- тиче- ский конструк т
Гуманизи- рованный	hu-VL4	IGKV3- 11*01	ENVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASSSVISS YLHWYQQKPGQAPRLLIYSTSNR ATGIPARF SGSGSGTDYTLTISSLEPEDFA VYYCQQYNS YPLTFGGGTKLEIK	16	Белки	синте- тиче- ский конструк т

Таблица 2. Аффинность связывания иллюстративного агонистического антитела к PD-1

Антитело	Название VH	Название VL	Связывание PD-1 человека, K_D (нМ)	Связывание PD-1 яванского макака, K_D (нМ)
Исходное	VH	VL	53,7	318
humCL19v1	hu-VH1	hu-VL1	31,5	278
humCL19v2	hu-VH1	hu-VL2	1010	3410
humCL19v3	hu-VH1	hu-VL3	37,3	236
humCL19v4	hu-VH1	hu-VL4	32	199
humCL19v5	hu-VH2	hu-VL1	57,6	440
humCL19v6	hu-VH2	hu-VL2	2000	15200
humCL19v7	hu-VH2	hu-VL3	64,5	565
humCL19v8	hu-VH2	hu-VL4	58,9	369
humCL19v9	hu-VH3	hu-VL1	44,8	251
humCL19v10	hu-VH3	hu-VL2	670	8460
humCL19v11	hu-VH3	hu-VL3	52,5	249
humCL19v12	hu-VH3	hu-VL4	47,5	253

humCL19v13	hu-VH4	hu-VL1	160	1000
humCL19v14	hu-VH4	hu-VL2	80200	79200
humCL19v15	hu-VH4	hu-VL3	49000	101000
humCL19v16	hu-VH4	hu-VL4	161	896

Пример 3. Влияние мутации Fc на селективность связывания с FcγR2B

[0328] Гуманизированный вариант humCL19v1 рекомбинантно получали на hIgG1, hIgG4 или диапазоне различных мутантных по Fc константных областей hIgG1 и их связывание с FcγR2B человека или с двумя высокомолекулярными аллотипами FcγR2A оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (при 37 °C, в буфере HBS-EP+ при pH 7,4).

[0329] Взаимодействия оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием Biacore 8K с рекомбинантно экспрессированными FcR (только внеклеточные домены) в качестве аналита. Вкратце, рекомбинантный внеклеточный домен PD-1 человека ковалентно иммобилизовали в обеих проточных кюветах на всех каналах сенсорного чипа CM5 Series S с использованием набора GE Healthcare Amine Coupling Kit. Затем в проточной кювете 2 каждого канала выполняли захват анализируемого Fc-варианта humCL19v1 (приблизительно 500–1000 отвечающих единиц). Затем проводили анализ аффинности в стабильном состоянии путем введения различных концентраций FcR и измерения равновесного связывания. Использовали двойное референсирование (вычитание сигнала референса Fc1 и также вычитание сигнала впрыска пустой нулевой концентрации). Значения K_D вычисляли по кривым Ленгмюра (график равновесного связывания относительно концентрации аналита для определения концентрации, необходимой для полумаксимального связывания). Значения K_D связывания для каждого из вариантов для разных Fc-рецепторов показаны в таблице 3. Из протестированных вариантов Fc только мутация P238D усиливала селективность связывания с FcγR2B по сравнению с обоими аллотипами FcγR2A. Эта мутация привела к умеренному увеличению связывания с FcγR2B и к значительному снижению связывания с обоими аллотипами FcγR2A.

Таблица 3. Аффинность связывания иллюстративных антител

	K_D связывания (нМ)			Соотношение аффинности связывания FcγR2B: FcγR2A (131R)
	FcγR2B	FcγR2A 131R	FcγR2A 131H	
hIgG1	4,10	1,36	1,95	0,33
hIgG4	3,31	2,55	7,16	0,77
hIgG1 P238D	2,79	17,50	90,30	6,27
hIgG1 L235N	59,00	12,30	13,50	0,21
hIgG1 L235H	13,60	3,67	3,96	0,27
hIgG1 V266M	1,54	0,58	6,28	0,37
hIgG1 S239V	3,60	1,62	3,13	0,45

hIgG1 S239I	3,99	1,65	3,38	0,41
hIgG1 Y300N	6,32	2,22	2,83	0,35
hIgG1 P271Y	20,60	9,70	8,85	0,47

Пример 4. Мутантное по P238D антитело к PD-1 столь же эффективно, как и антитела IgG1, в подавлении активации Т-клеток в анализе репортера NFA

[0330] Чтобы оценить, влияет ли мутация P238D на агонистическую функцию humCL19v1, использовали анализ репортера Jurkat. Сравнение проводили как с немутантной версией IgG1 humCL19v1, так и с антителами изотипического агониста IgG1, которые были описаны ранее, включая PD1AB6 (WO 2017/058859 A1), PD1B1094 (WO 2018/226580 A2), антитело 1 (WO 2019/168745 A1) и ANB030 (WO 2020/247628 A2). Эти антитела получали рекомбинантно из последовательностей, представленных в соответствующих патентных заявках. Т-клетки Jurkat, которые продуцируют люциферазу под контролем элемента ответа NFAT, культивировали с клетками BW5147, экспрессирующими конструкцию антитела к CD3 «стимуляторной Т-клетки» (TCS), как описано ранее (Leitner et al. 2010), и экспрессию FcγR2B человека.

[0331] 5×10^4 репортерных клеток Jurkat (Promega, № по каталогу J1250b) добавляли лунку 96-луночного планшета с U-образным дном и культивировали с 5×10^4 клетками BW5147 плюс либо антитело к PD-1, либо изотипический контроль, в общем объеме 80 мкл буфера для анализа (RPMI 1640 + 1% FCS). Тестировали однократную высокую дозу каждого антитела к PD-1 (10 мкг/мл).

[0332] Через 6 часов инкубации в увлажненном CO₂ в инкубаторе при 37 °C планшеты удаляли из инкубатора и уравнивали до комнатной температуры в течение 10 минут. Количество полученной люциферазы количественно определяли (в качестве меры активации Т-клеток) с использованием системы Bio-Glo™ Luciferase Assay System (Promega); в каждую лунку добавляли 80 мкл Bio-Glo™ Luciferase Assay Reagent и планшеты инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Люминесценцию количественно определяли с использованием CLARIOstar Plus (BMG Labtech).

[0333] Все антитела к PD-1 тестировали значительно снижали активацию Т-клеток по сравнению с изотипическим контролем. Не было существенной разницы между IgG1 дикого типа или мутантными версиями P238D humCL19v1 (**фигура 2А**).

[0334] В другом наборе экспериментов оптимизированный анализ Т-клеточного репортера использовали для оценки эффективности мутантной версии P238D humaCL19v1. Анализ Т-клеточного репортера был аналогичен анализу, описанному выше в данном примере, но клетки стимулятора BW5147 мыши заменяли стимуляторными клетками HEK293T человека. Т-клетки Jurkat, которые продуцируют люциферазу под контролем элемента

ответа NFAT, культивировали с клетками HEK293T, экспрессирующими конструкцию антитела к CD3 «стимуляторной Т-клетки» (TCS), как описано ранее (Leitner et al. 2010), и экспрессию FcγR2B человека.

[0335] 4×10^4 стимуляторных клеток HEK293T высевали в лунку в 96-луночные планшеты с плоским дном. Через 16 часов среду удаляли и добавляли 5×10^4 репортерных клеток Jurkat (Promega, № по каталогу J1250b) на лунку, плюс либо антитело к PD-1, либо изотипический контроль, в общем объеме 80 мкл буфера для анализа (RPMI 1640 + 1% FCS). Тестировали 5-кратное последовательное разведение антитела, начиная с 5 мкг/мл.

[0336] Через 6 часов инкубации в увлажненном CO₂ в инкубаторе при 37 °C планшеты удаляли из инкубатора и уравнивали до комнатной температуры в течение 10 минут. Количество полученной люциферазы количественно определяли (в качестве меры активации Т-клеток) с использованием системы Bio-Glo™ Luciferase Assay System (Promega); в каждую лунку добавляли 80 мкл Bio-Glo™ Luciferase Assay Reagent и планшеты инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Люминесценцию количественно определяли с использованием CLARIOstar Plus (BMG Labtech). Как показано на **фигуре 2В**, humCL19v1 P238D ингибировал активацию Т-клеток до 84%, по оценке с помощью индуцированного NFAT люминесцентного сигнала с IC₅₀ 0,0278 нМ.

Пример 5. Мутантное по P238D антитело к PD-1 столь же эффективно, как и антитела IgG1, при подавлении активации первичных Т-клеток в анализах активации Т-клеток

[0337] В одном наборе экспериментов использовали анализ активации столбнячным анатоксином для оценки ингибирующих эффектов иллюстративных антител на активацию Т-клеток. Общее количество мононуклеарных клеток периферической крови человека (РВМС) от здоровых доноров (400 000 клеток на лунку 96-луночного планшета) стимулировали столбнячным анатоксином (0,5 мкг/мл) в присутствии блокирующих PD-L1/2 антител (5 мкг/мл каждый) и 1 мкг/мл агонистического антитела к PD-1 или изотипического контроля. Высвобождение IFN γ оценивали с помощью ELISA супернатанта после 96-часовой инкубации при 37 °C, 5% CO₂. Проводили оценку и данные 6 доноров путем нормализации каждого донора с уровнем IFN γ в клетках, активированных столбнячным анатоксином в отсутствие тестируемого антитела.

[0338] Тестируемые антитела включали мутантное по P238D humCL19v1, немутантную версию IgG1 humCL19v1 и агонистические антитела изотипа IgG1, которые были описаны ранее, включая PD1AB6 (WO 2017/058859 A1) и антитело 1 (WO 2019/168745 A1). Эти

антитела получали рекомбинантно из последовательностей, представленных в соответствующих патентах.

[0339] Среднее значение для протестированных доноров, индуцированное столбнячным анатоксином (ТТ), привело к приблизительно 2-кратному увеличению продуцирования IFN γ по сравнению с культивированием PBMC без ТТ. Изотипический контроль IgG1 немного снижал продуцирование IFN γ . Все humCL19v1 P238D, humCL19v1 IgG1 и PD1AB6 значительно снижали продуцирование IFN γ по сравнению с изотипическим контролем. Не было существенной разницы между IgG1 дикого типа или мутантными версиями P238D humCL19v1 (**фигура 3А**).

[0340] В другом наборе экспериментов использовали анализ активации вирусного пептида для оценки ингибирующих эффектов иллюстративных антител на активацию иммунных клеток. Общие мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) от здоровых доноров (500 000 клеток на лунку 96-луночного планшета с U-образным дном) стимулировали 2 мкг/мл пептидов CEF HLA класса I (объединенную смесь А пептидов из цитомегаловируса, вируса Эпштейна – Барр и гриппа, Mabtech, № по каталогу 3618-1) в присутствии 5 мкг/мл Brefeldin A (Biolegend, № по каталогу 420601) и 1 мкг/мл антитела к PD-1 или изотипического контроля hIgG1, мутантного по P238D, или без антитела. Процент продуцирующих IFN γ клеток в популяции CD8 Т-клеток оценивали с помощью внутриклеточной проточной цитометрии после 16 часов инкубации при 37 °С, 5% CO $_2$. Оценивали 18 доноров. Данные сопоставляли путем нормализации каждого донора с использованием приведенной ниже формулы:

(продуцирование цитокинов в присутствии антитела - нестимулированный фон)/(продуцирование цитокинов в стимулированных клетках без антитела - нестимулированный фон).

[0341] Усредненный по протестированным донорам пептидам CEF индуцировали 4-кратное увеличение CD8 IFN γ -продуцирующих Т-клеток по сравнению с культивированием PBMC без пептидов CEF. humCL19v1 P238D значительно снижало уровень IFN γ в среднем на 63% по сравнению с контролем в виде отсутствия антител. (**Фигура 3В**).

Пример 6. Мутантное по P238D антитело к PD-1 столь же эффективно, как и антитела IgG1, в подавлении активации первичных Т-клеток в анализе активации антителом к CD3/28

[0342] Общее количество мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека от здоровых доноров (100 000 клеток на лунку 96-луночного планшета с U-образным дном)

стимулировали растворимыми антителами к CD3 и антителами к CD28 (конечная концентрация 0,5 нг/мл каждого) в присутствии 1 мкг/мл агонистического антитела к PD-1 или изотипического контроля. Экспрессию CD25 на CD4 Т-клетках оценивали с помощью проточной цитометрии в качестве маркера активации Т-клеток после 72 часов инкубации при 37 °С, 5% CO₂. Сопоставляли данные от нескольких доноров путем нормализации каждого донора с геометрическим средним CD25 в клетках, активированных антителом к CD3 и антителом к CD28 в отсутствие тестируемого антитела.

[0343] Тестируемые антитела включали мутантное по P238D humCL19v1 и агонистические антитела IgG1, которые были описаны ранее, включая PD1AB6 (WO 2017/058859 A1) и антитело 1 (WO 2019/168745 A1). Эти антитела получали рекомбинантно из последовательностей, представленных в соответствующих патентах.

[0344] Антитело к CD3 и антитело к CD28 приводили к значительному увеличению экспрессии CD25, что было значительно ингибировано всеми протестированными антителами к PD-1 (**фигура 4**).

Пример 7. Изотипические антитела IgG1 к PD-1 приводят к обусловленному ADCC уничтожению регуляторных Т-клеток *in vitro*, а мутантное по P238D антитело к PD-1 - нет

[0345] *In vitro* анализ дегрануляции NK-клеток использовали для изучения потенциала антител к PD-1 в истощении регуляторных Т-клеток путем ADCC. Treg очищали путем магнитного выделения от PBMC здоровых доноров с использованием набора для выделения CD4⁺ CD25⁺ CD127^{dim} /-регуляторных Т-клеток Kit II от Miltenyi (№ по каталогу 130-094-775). NK-клетки аналогичным образом очищали с использованием набора для выделения NK-клеток человека от Miltenyi (№ по каталогу 130-092-657).

[0346] 20 000 выделенных NK-клеток высевали на лунку в 96-луночный планшет с U-образным дном с 1 мкг/мл различных антител к PD-1 или изотипического контроля IgG1. Тестируемые антитела включали мутантное по P238D humCL19v1, немутантную версию IgG1 humCL19v1 и агонистические антитела изотипа IgG1, которые были описаны ранее, включая PD1B1094 (WO 2018/226580 A2) и антитело 1 (WO 2019/168745 A1). Эти антитела получали рекомбинантно из последовательностей, представленных в соответствующих патентных заявках.

[0347] 100 000 Treg-клеток добавляли на лунку с получением соотношения эффектор:мишень 1:5. Наконец, антитело к CD107a (Biolegend, № 328638) добавляли в каждую лунку для конечного разбавления 1 в 100 вместе с монензином (Biolegend, № 420701) и Brefeldin (Biolegend, № 420601) с получением конечной концентрации 1x

каждого. Конечный объем лунки составлял 200 мкл. Аналитическую смесь инкубировали в течение 6 часов при 37 С в 5% CO₂. Затем аналитическую смесь окрашивали панелью антител, включающей CD3, маркер мертвых клеток, и CD56 фиксировали 1% формальдегида и оценивали с помощью проточной цитометрии. Полученные данные анализировали с помощью FlowJo V10. Дегранулированные NK-клетки идентифицировали как CD107+CD56+ клетки. Мертвые клетки Treg идентифицировали как CD3+ клетки, положительные по маркеру мертвых клеток.

[0348] Изотипические антитела IgG1 к PD-1 приводили к значительной активации дегрануляции NK-клеток (**фигура 5**). Мутантный по P238D humCL19v1 не вызывал дегрануляцию NK-клеток или смерть Treg.

Пример 8. humCL19v1 P238D способно дополнительно ингибировать активацию T-клеток в присутствии высоких уровней PD-L1, в то время как другие агонистические антитела к PD-1 — нет

[0349] Клеточную линию репортера PD-1 использовали для оценки влияния мутантных по P238D humCL19v1 по сравнению с ранее описанными агонистическими антителами к PD-1 в условиях высокой экспрессии PD-L1.

[0350] Экспрессирующие PD-L1 клетки CHOК1, которые экспрессируют конструкцию T-клеточного стимулятора (Promega, № по каталогу J1250a), высевали в 40 000 клеток на лунку в 96-луночной планшете с плоским дном и инкубировали в течение ночи для прикрепления к планшету. На следующий день супернатант удаляли и 50 000 экспрессирующих PD-1 репортерных клеток Jurkat, экспрессирующих люциферазу под контролем элемента ответа NFAT, добавляли вместе с антителом к PD-1 или изотипическим контролем. Титры дозы антител к PD-1 оценивали с использованием 4-кратных разведений от 10 мкг/мл в общем объеме на лунку 80 мкл. После 6-часовой инкубации при 37 С добавляли 80 мкл Bio-Glo и инкубировали в течение 15 мин, затем считывали на устройстве для считывания планшетов Clariostar с использованием настройки Firefly Luciferase для количественного определения продуцирования люциферазы.

[0351] Тестируемые антитела включали мутантное по P238D humCL19v1 и агонистический антитела изотипа IgG1, которые были ранее описаны, включая PD1AB6 (WO 2017/058859 A1), PD1B1094 (WO 2018/226580 A2), антитело 1 (WO 2019/168745 A1) и ANB030 (WO 2020/247628 A2). Эти антитела получали рекомбинантно из последовательностей, представленных в соответствующих патентах. В качестве контроля также оценивали биоаналог антитела, блокирующего PD-1, ниволумаба.

[0352] Как и ожидалось, ниволумаб привел к значительному зависимому от дозы усилению активации Т-клеток за счет блокирования взаимодействия PD-L1 с PD-1. Неожиданно было обнаружено, что только мутантное по P238D антитело humCL19v1 продемонстрировало способность дополнительно подавлять активацию Т-клеток (за пределами ингибирования, уже обеспечиваемого взаимодействием PD-L1 с PD-1). Ни одно из других тестируемых антител к PD-1 не влияло на активацию Т-клеток (**фигура 6**).

Пример 9. humCL19v1 P238D обладает способностью ингибировать активацию Т-клеток в RA PBMC, совместно культивированных с фибробластами

[0353] Чтобы исследовать влияние агонистов PD-1 на Т-клетки от пациентов с ревматоидным артритом (RA), PBMC от 4 доноров с RA активировали в условиях совместного культивирования с фибробласто-подобных синовицитов RA (FLS, от Tebu-bio, № 408RAK-05a). Стромальные клетки, такие как фибробласты, экспрессируют PD-L1 и PDL-2, и поэтому этот анализ представляет собой физиологическую ситуацию, в которой присутствуют лиганды PD-1 (Dezutter-Dambyant et al. 2016).

[0354] В плоские 96-луночные планшеты высевали по 10 000 клеток FLS в 50 мкл среды и оставляли для прикрепления в течение 2 часов. Затем в 50 мкл среды добавляли 100 000 PBMC. Антитела к PD-1 (humCL19v1 P238D или Антитело 1 из WO 2019/168745 A1) или изотипический контроль добавляли в 50 мкл среды до конечной концентрации 1 мкг/мл. Наконец, добавляли антитело к CD3 (клон ОКТ3) и антитело к CD28 (клон CD28.2) в 50 мкл среды до конечной концентрации 0,5 нг/мл каждого. Через 3 дня инкубации при 37 C, 5% CO₂ супернатант собирали и оценивали с помощью цитометрического массива гранул (Панель Biolegend Th17, № 741032), а клетки оценивали с помощью проточной цитометрии с маркерами CD3, CD4, CD25 и ICOS. Агонистическое humCL19v1 P238D привело к значительному снижению маркеров активации Т-клеток на CD4 Т-клетках, включая CD25 (**фигура 7A**) и ICOS (**фигура 7B**), а также значительное снижение продуцирования воспалительных цитокинов, включая IFN γ (**фигура 7C**), IL17F (**фигура 7D**) и TNF α (**фигура 7E**). Эталонное агонистическое антитело 1 не оказывало существенного влияния на любой из этих показателей. Эти данные свидетельствуют о том, что humCL19v1 P238D может быть активным в условиях, где экспрессируются лиганды PD-1, тогда как другие описанные агонисты PD-1 могут быть неэффективными в этих условиях.

Пример 10. humCL19v1 P238D усиливает взаимодействие PD-L1 с PD-1

[0355] Связывание PD-L1 с экспрессирующими PD-1 клетками оценивали в присутствии различных антител к PD-1. Экспрессирующие PD-1 Т-клетки Jurkat инкубировали с

антителом к PD-1 или изотипическим контролем в концентрации 10 мкг/мл на льду в течение 1 часа. Затем клетки промывали и инкубировали в течение 30 минут с возрастающими концентрациями PDL1-Fc (Biolegend, № 762506), которые были конъюгированы с AF647 с использованием набора для конъюгации (Thermoisher, № A20186). Затем клетки снова промывали и оценивали с помощью проточной цитометрии. Клетки, которые были предварительно инкубированы с humCL19v1 P238D, продемонстрировали более яркое окрашивание с помощью PDL1-Fc, чем клетки, которые были предварительно инкубированы без антитела, с изотипическим контролем или другими описанными антителами к PD-1 (**фигура 8**). Клетки, предварительно инкубированные с ниволумабом, не продемонстрировали связывания с PDL1-Fc, как и ожидалось, из-за его блокирующего лиганд эпитопа. Эти данные свидетельствуют о том, что связывание humCL19v1 с PD-1 усиливает его взаимодействие с PD-L1.

Пример 11. Гены, понижающе регулируемые агонистом PD-1, связаны с аутоиммунитетом

[0356] Способы, аналогичные описанным в **примере 1** использовали для определения сигнатуры транскрипции агонизма PD-1 клоном 19. Добавляли 1,5 миллиона экспрессирующих PD-1 репортерных Jurkat на лунку 6-луночного планшета с плоским дном в 1 мл буфера для анализа (RPMI + 1% FCS), содержащего 10 мкг/мл тестируемого антитела, затем 1,5 миллиона экспрессирующих FcR стимуляторных клеток добавляли в 1 мл буфера для анализа (для получения конечной концентрации антител 5 мкг/мл). Для покоящихся образцов добавляли 1,5 миллиона Jurkat в 2 мл буфера для анализа в пустые лунки. Все условия проводили в 6 технических повторностях. Все образцы инкубировали при 37 C в течение 18 часов. Затем 80 мкл клеток из каждого образца переносили в белый 96-луночный планшет для оценки люциферазы (как описано в **примере 1**) (**фигура 9А**), 80 мкл переносили в 96-луночный планшет для оценки проточной цитометрией, а затем из остальных стимуляторных клеток образца истощали с помощью отрицательного отбора с использованием покрытых CD45 мыши наногранул MojoSort (Biolegend, № 480028). Из оставшихся клеток 80 мкл переносили в 96-луночный планшет для оценки проточной цитометрией для проверки чистоты клеток Jurkat (**фигура 9В**). Остаток осаждали центрифугированием, супернатант аспирировали, затем клетки замораживали при -80. Образцы подвергали экстракции РНК и секвенированию в GeneWis с использованием протокола библиотека с сохранением информации о кодирующей цепи с целевой глубиной секвенирования по меньшей мере 20М считываний на образец.

[0357] Файлы секвенирования РНК из GeneWis обрабатывали с использованием конвейера rnoseq (v3.1) Nextflow в nf-core. FastQC использовали для подтверждения качества секвенирования, а Salmon использовали для сведения транскриптов к геному человека (GRCh38 v96). Для проведения всех последующих анализов использовали собственный конвейер дифференциальной экспрессии с применением tximport для получения подсчета генов из оценочных представленности транскриптов, DESeq2 для выполнения дифференциальной экспрессии между группами (без корректировки на дополнительные ковариаты) и пакета EnrichR для проведения анализов обогащения гена для наборов генов, экспрессия которых значительно выше или ниже в разных группах; с использованием различных баз данных набора генов посредством Enrichr. Наборы генов, значительно повышающих или понижающих экспрессию между группами, определяли на основании их логарифмического изменения в анализе DESeq2, где корректное р-значение гена FDR составляло менее 0,05. 1227 генов были в значительной степени подавлены в клетках, активированных в присутствии агониста PD-1, по сравнению с активацией в присутствии изотипического контроля (**фигура 9C**). Картирование этого набора подавленных генов по каталогу EBI GWAS выявило обогащение генов, связанных с аутоиммунным заболеванием, в частности, с сероположительным ревматоидным артритом (**фигура 9D**). Эти данные свидетельствуют о том, что агонизм антител в отношении путей PD-1 может снижать пути воспалительных генов, связанных с аутоиммунитетом

Пример 12. Лечение мышинной модели системной красной волчанки

[0358] Эффективность иллюстративного антитела клон 19 при лечении модели заболевания SLE тестировали на модели переноса, где заболевание индуцировали у мышей-реципиентов H2-Ab1bm12 путем переноса частично несовпадающих по MHC-II спленоцитов от гуманизированных по PD-1 мышей. Системная красная волчанка (SLE) представляет собой хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся нарушением аутоотолерантности и продуцированием аутоантител против ядерных антигенов, таких как хроматин и ДНК. Отложение иммунных комплексов в различных органах, включая почки и кожу, приводит к разнообразным клиническим проявлениям. Им может страдать около 0,1% популяции с повышенной частотой у женщин детородного возраста и у некоторых этнических групп, включая афроамериканцев, азиатов, латиноамериканцев и коренных американцев (Izmirly et al., 2021). Существующие терапии включают противовоспалительные и иммуносупрессивные средства, такие как кортикостероиды, которые могут способствовать лечению симптомов, но вылечить это заболевание невозможно, и остается потребность в более эффективных способах лечения.

[0359] Эффективность клона 19 при облегчении заболевания тестировали на мышинной модели SLE. Ранее была описана модель переноса SLE, в которой заболевание индуцируется путем переноса нефракционированных спленоцитов от bm12 мышей-доноров мышам-реципиентам C57BL/6, или наоборот (Klarquist & Janssen, 2015). Мыши Bm12 отличаются от мышей C57BL/6 3 аминокислотами в антигенном HC-2A MHC класса II. Такое несовпадение по MHC приводит к аллогенному ответу, в котором CD4 T-клетки донора становятся активированными, дифференцируются в фолликулярные хелперные клетки (Tfh) и обеспечивают образование зародышевых центров с получением аутоантител. Использовали адаптированный протокол, в котором донорные спленоциты получали от мышей C57BL/6, гуманизированных по локусу гена PD-1, для обеспечения оценки агонистического антитела к PD-1 человека клона 19. Эти мыши ранее были описаны и охарактеризованы в PhD These Billur Akaya (Akka, 2012). Это обеспечивает модель, в которой T-клетки, инициирующие заболевание, являются мишенью для антитела к антителу человека, хотя некоторые иммунные клетки, распространяющие заболевание (такие как B-клетки реципиента), не экспрессируют PD-1 человека.

[0360] Мышей-доноров C57BL/6, гуманизированные по локусам гена PD-1, умерщвляли и селезенки собирали в среду RPMI + 2%FCS + P/S/N. Мышей bm12, также умерщвляли, чтобы обеспечить донорные спленоциты для контролей с отсутствием заболевания. Селезенки обрабатывали до суспензии отдельных клеток, продавливая их через нейлоновые сетчатые фильтры 70 мкм с использованием плунжера шприца объемом 5 мл. Затем клетки осаждали и ресуспендировали в PBS в концентрации 200 миллионов клеток на мл. Затем 200 мкл этой клеточной суспензии инъецировали внутрибрюшинно на мышью-реципиента (40 миллионов клеток на мышью). Взрослых мышей bm12 (Jax Stock, № 00116) использовали в качестве реципиентов. Самки-реципиенты получали клетки от самок-доноров, и самцы-реципиенты получали клетки от самцов-доноров. Тестируемые и контрольные антитела разводили до 1 мг/мл в стерильном PBS и инъецировали IP. Группы распределяли между клетками, чтобы избежать искажающего влияния клеток. Дексаметазон вводили контрольной группе в питьевой воде (поэтому эти мыши должны были быть сгруппированы в одни и те же клетки). Предполагалось, что для обеспечения приблизительно 0,5 мг/кг/сутки среднесуточное потребление составит 0,2 мл/г. Дексаметазон сначала восстанавливали при 10 мг/мл в 100% этаноле, затем разбавляли до 2,5 мкг/мл (1 к 4000) в питьевой воде.

[0361] В первом исследовании мышам внутрибрюшинно вводили 200 мкг тестируемого антитела или изотипического контроля mIgG1 в дни 1 и 22 после переноса клеток. Контрольной группе вводили дексаметазон в питьевой воде с дня 1 до окончания в день 35.

У мышей собирали кровь путем венепункции хвостовой вены до введения дозы в день 22 для проведения ELISA сывороточных аутоантител и в день 35, когда исследование было прекращено. Селезенки также собирали и оценивали с помощью проточной цитометрии для количественного определения размножения иммунных клеток, включая размножение донорских Tfh-клеток (гейтированных в виде CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ клеток). Клон 19 приводил к почти полному предотвращению заболевания, оцениваемому по уровням аутоантител (**фигуры 10А–10В**), частоте Tfh (**фигура 10С**) или спленомегалии (**фигура 10D**). Размер эффекта был эквивалентен дексаметазону, вводимому на протяжении всего исследования. Наблюдали высокую степень вариабельности между необработанными мышами, при этом у некоторых не смогли прижиться донорские клетки. Размер эффекта был эквивалентен дексаметазону, вводимому на протяжении всего исследования.

[0362] В другом эксперименте клон 19 вводили в разные моменты времени, введение в день 0 полностью предотвращало размножение донорских Tfh и значительно снижало другие маркеры развития заболевания (**фигуры 11А–11В**). Введение в день 14 привело к частичному снижению маркеров заболевания. Введение в день 28 (до прекращения исследования в день 30) не приводило к значительному снижению любых маркеров, включая частоту Tfh-клеток. Поскольку Tfh-клетки экспрессируют высокие уровни PD-1 человека, можно ожидать, что они будут значительно истощены в течение этого 48-часового временного интервала, если клон 19 действует в качестве истощающего антитела посредством ADCC или CDC.

Пример 13. Агонист PD-1 ингибирует ответ гиперчувствительности замедленного типа у гуманизированных мышей

[0363] Мышей C57BL/6 гуманизировали по локусу гена PD-1 для оценки влияния агонистического в отношении PD-1 клона 19 на ответ гиперчувствительности замедленного типа в модели стимуляции кожи, относящейся к аутоиммунным заболеваниям кожи. В день 0 мышам иммунизировали гемоцианином лимфы улитки (KLH) в полном адьюванте Фрейнда (CFA). Эмульсию представляла собой смесь KLH (Sigma) в PBS, добавляемую в CFA (BD Biosciences) в соотношении 1:1. Конечная концентрация KLH составляла 4 мг/мл. Животных иммунизировали 100 мкл эмульсии для иммунизации, вводимой подкожно в 1–2 участках. Нестимулированная контрольная группа получала только PBS. Также в день 0 мышам обрабатывали за 1 час до иммунизации либо изотипическим контролем mIgG1 (клон Морс21), либо клоном 19 mIgG1 антитела к PD-1 внутрибрюшинно одной дозой 10 мг/кг. Нестимулированная контрольная группа получала только PBS. Животные в контрольной группе положительной обработки получали через пероральный зонд CsA в дозе 3 мг/кг

один раз в сутки в день 0–5. Для получения CsA раствор Sandimmune Neoral (Novartis) разбавляли до 0,3 мг/мл в 0,5% метилцеллюлозе 400 сП (Sigma). Через пять дней после иммунизации мышам в левую ушную раковину (под анестезией) вводили 20 мкл раствора 4 мг/мл антигена. Нестимулированная контрольная группа получала 20 мкл PBS в левую ушную раковину. Через день после стимуляции измеряли толщину уха с помощью цифровых штангенциркулей. После измерения толщины уха животных осторожно умерщвляли и после вскрытия вырезали круг диаметром 8 мм с помощью пуансона для биопсии из левого и правого уха каждого животного из всех групп. Уши взвешивали на точных аналитических весах. Отек уха оценивали как разницу между массой левого уха (стимулированного) и правого уха (контрольного). Агонистический в отношении PD-1 клон 19 приводил к значительному ингибированию отека уха (**фигура 12А**).

[0364] В другом эксперименте мышей обрабатывали в день 0, за 1 час до иммунизации с помощью 10, 1, 0,1 или 0,01 мг/кг клона 19 внутрибрюшинно. В этом исследовании в качестве положительного контроля использовали слитый белок CTLA-Ig (Biolegend, № по каталогу 591908), вводимый в дозе 10 мг/кг IP за 1 час до иммунизации в день 0. Клон 19 при дозах 10 мг/кг или 1 мг/кг привел к значительному ингибированию отека уха, сопоставимому с эффектом CTLA4-Ig (**фигура 12В**).

Пример 14. Агонист PD-1 облегчает симптомы болезни «трансплантат против хозяина» в мышинной модели

[0365] В одной серии экспериментов определяли влияние humCL19v1 P238D на болезнь «трансплантат против хозяина» (GvHD), вызванную РВМС человека *in vivo*. Вкратце, самок мышей NSG (JAX Labs, Stock № 05557) возрастом приблизительно 8–10 недель облучали путем облучения всего тела дозой 2,4 Гр (в день -1). Мононуклеарные клетки периферической крови человека (РВМС) выделяли из лейкопак (продукт HemaCare, заказан через Tissue Solutions) и ресуспендировали в количестве 25×10^6 клеток на мл PBS. Мышам вводили 200 мкл клеточной суспензии (5×10^6 РВМС) внутривенно (IV) путем инъекции в хвост через 1 день после облучения (в день 0). Кроме того, в день 0 и в дни 7, 14 и 21 мышей обрабатывали 10 мг/кг humCL19v1 P238D или мутантного по P238D изотипического контроля hIgG1 путем внутрибрюшинной инъекции. Мышей регулярно взвешивали и умерщвляли при потере 15% массы тела или через 28 дней. При прекращении исследования периферическую кровь собирали для оценки воспалительных цитокинов с помощью цитометрического массива гранул. По завершению исследования инфильтрацию человеческих РВМС в печень и селезенку количественно оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием маркеров hCD45, hCD4, hCD8, hCD20, hCD25 и FOXP3.

продуцирование IFN γ CD8 и CD4 T-клетками в селезенке и печени также оценивали с помощью внутриклеточной проточной цитометрии.

[0366] Согласно процедурам, описанным выше, humCL19v1 P238D значительно снижало массу селезенки (**фигура 13A**), размножение иммунных клеток человека в селезенке (**фигура 13B**) и печени (**фигура 13C**) и уровни воспалительных цитокинов в сыворотке (**фигура 13D**) по сравнению с изотипическим контролем. Кроме того, в дополнение к снижению общих уровней цитокинов humCL19v1 P238D также снижало продуцирование цитокинов CD4 и CD8 на клеточной основе, что оценивали с помощью внутриклеточной проточной цитометрии иммунных клеток человека в печени и селезенке (**фигура 13E**).

[0367] Хотя в данном документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены исключительно в качестве примера. Специалистам в данной области будут очевидны многочисленные вариации, изменения и замены без отступления от описания. Следует понимать, что для практического применения настоящего описания можно использовать различные альтернативы вариантам осуществления настоящего изобретения. Предполагается, что приведенная ниже формула изобретения определяет объем настоящего изобретения, и что способы и конструкции в пределах объема этих пунктов формулы изобретения и их эквиваленты охватываются ими.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ подавления иммунной клетки, которая экспрессирует белок программируемой смерти 1 (PD-1), включающий приведение иммунной клетки в контакт с антителом, которое специфически связывается с PD-1, и агонизирует передачу сигналов PD-1 в иммунной клетке, при этом антитело содержит Fc-область, которая содержит аминокислотную замену, и при этом аминокислотная замена приводит к снижению зависимой от антитела клеточной цитотоксичности (ADCC) против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки у субъекта по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит аминокислотную замену, и при этом антитело оказывает тот же или более высокий агонистический эффект на передачу сигналов PD-1 в иммунной клетке по сравнению с исходной молекулой.
2. Способ подавления иммунной клетки, которая экспрессирует белок программируемой смерти 1 (PD-1), включающий приведение иммунной клетки в контакт с антителом, которое специфически связывается с PD-1, и которое усиливает взаимодействие PD-1 с PD-L1 на поверхности иммунной клетки.
3. Способ по п. 2, в котором антитело содержит Fc-область, и при этом Fc-область содержит аминокислотную замену.
4. Способ по п. 3, в котором аминокислотная замена приводит к снижению зависимой от антитела клеточной цитотоксичности (ADCC) против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки у субъекта по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит аминокислотную замену, и при этом антитело оказывает тот же или более высокий агонистический эффект на передачу сигналов PD-1 в иммунной клетке по сравнению с исходной молекулой.
5. Способ по п. 1 или п. 4, в котором ADCC против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки снижается, что определено с помощью анализа активации природных клеток-киллеров, описанном в примере 7.
6. Способ по любому из пп. 1–5, в котором антитело не приводит к значительной ADCC против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки, что определено с помощью анализа активации натуральных клеток-киллеров, описанном в примере 7.

7. Способ по любому из пп. 1–6, в котором антитело не активирует натуральные клетки-киллеры (NK).
8. Способ по любому из пп. 1–7, в котором антитело содержит тяжелую цепь, которая содержит переменную область тяжелой цепи, и легкую цепь, которая содержит переменную область легкой цепи.
9. Способ по п. 8, в котором переменная область тяжелой цепи содержит определяющую комплементарность область (CDR), содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 1–3, с 0–3 аминокислотными модификациями.
10. Способ по любому из пп. 3–9, в котором Fc-область получена из IgG1 и содержит аспарагиновую кислоту (D) в положении 238, пронумерованном в соответствии с нумерацией EU.
11. Способ подавления иммунной клетки, которая экспрессирует белок программируемой смерти 1 (PD-1), включающий приведение иммунной клетки в контакт с антителом, которое содержит тяжелую цепь, легкую цепь и Fc-область, при этом
 - (i) тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 1–3, с 0–3 аминокислотными модификациями;
 - (ii) легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, которая содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 4–6, с 0–3 аминокислотными модификациями; и
 - (iii) Fc-область получена из IgG1 и содержит аспарагиновую кислоту (D) в положении 238, пронумерованном в соответствии с нумерацией EU.
12. Способ по любому из пп. 8–11, в котором переменная область легкой цепи содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 4–6, с 0–3 аминокислотными модификациями.
13. Способ по любому из пп. 8–12, в котором переменная область тяжелой цепи содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDRH1), CDRH2 и

CDRH3, и при этом CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1–3, соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями.

14. Способ по любому из пп. 8–13, в котором переменная область легкой цепи содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDRL1), CDRL2 и CDRL3, при этом CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4–6, соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями.

15. Способ по любому из пп. 8–14, в котором переменная область тяжелой цепи содержит CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и при этом CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1–3 соответственно.

16. Способ по любому из пп. 8–15, в котором переменная область легкой цепи содержит CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и при этом CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4–6, соответственно.

17. Способ по любому из пп. 8–16, в котором переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 7–11.

18. Способ по любому из пп. 8–17, в котором переменная область легкой цепи содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 12–16.

19. Способ по любому из пп. 8–18, в котором тяжелая цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 18.

20. Способ по любому из пп. 8–19, в котором легкая цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 19.

21. Способ по любому из пп. 3–20, в котором Fc-область получена из IgG1 человека.
22. Способ по любому из пп. 3–21, в котором Fc-область содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 17.
23. Способ по любому из пп. 8–22, в котором переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи образуют структуру, выбранную из группы, состоящей из scFv, sc(Fv)₂, dsFv, Fab, Fab', (Fab')₂ и димера.
24. Способ по любому из пп. 1–22, в котором переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи образуют одноцепочечный переменный фрагмент (ScFv), который функционально связан с Fc-областью.
25. Способ по любому из пп. 1–24, в котором антитело выбрано из группы, состоящей из антитела человека, гуманизированного антитела, химерного антитела и мультиспецифического антитела.
26. Способ по любому из пп. 1–25, в котором антитело является моноклональным.
27. Способ по любому из пп. 1–26, в котором антитело снижает активацию иммунной клетки по меньшей мере на около 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% или 50%.
28. Способ по любому из пп. 1–26, в котором антитело снижает активацию иммунной клетки на от около 10% до 50%, от 10% до 40%, от 10% до 30%, от 10% до 20%, от 10% до 15%, от 20% до 50%, от 20% до 40% или от 20% до 30%.
29. Способ по любому из пп. 2–28, в котором иммунная клетка включает Т-клетку, В-клетку или макрофаг.
30. Способ по любому из пп. 2–28, в котором иммунная клетка включает антигенспецифическую Т-клетку.

31. Способ по любому из пп. 3–30, в котором Fc-область селективно связывается с FcγR2B.
32. Способ по п. 31, в котором антитело связывается с FcγR2B человека с K_D менее 5 мкМ, 4 мкМ, 3 мкМ или 2 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С.
33. Способ по п. 31 или п. 32, в котором антитело связывается с FcγR2A человека (аллотип 131R) с K_D более 5 мкМ или 10 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С.
34. Способ по п. 31 или п. 32, в котором антитело связывается с FcγR2A человека (аллотип 131R) с K_D по меньшей мере 15 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С.
35. Способ по любому из пп. 31–34, в котором антитело связывается с FcγR2A человека (аллотип 131H) с K_D по меньшей мере 50 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С.
36. Способ по любому из пп. 31–34, в котором антитело связывается с FcγR2A человека (аллотип 131H) с K_D по меньшей мере 80 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С.
37. Способ по любому из пп. 31–36, в котором соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131R) составляет по меньшей мере 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 или 6:1.
38. Способ по любому из пп. 31–36, в котором соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131R) составляет по меньшей мере 6:1.
39. Способ по любому из пп. 31–36, в котором соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131R) составляет около 6:1.

40. Способ по любому из пп. 31–39, в котором соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131H) составляет по меньшей мере 10:1, 15:1, 20:1, 40:1 или 50:1.

41. Способ по любому из пп. 31–39, в котором соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131H) составляет по меньшей мере 40:1.

42. Способ по любому из пп. 31–39, в котором соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131H) составляет около 40:1.

43. Способ по любому из пп. 37–42, в котором соотношение определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °C.

44. Выделенное антитело, которое специфически связывается с белком программируемой смерти 1 (PD-1) и агонизирует передачу сигналов PD-1, при этом антитело содержит тяжелую цепь, легкую цепь и Fc-область,
при этом тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи,
при этом легкая цепь содержит переменную область легкой цепи,
при этом Fc-область содержит аминокислотную замену, которая приводит к снижению зависимой от антитела клеточной цитотоксичности (ADCC) против экспрессирующей PD-1 регуляторной T-клетки по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит замену, и
при этом антитело обладает тем же или более высоким агонистическим эффектом на передачу сигналов PD-1 в иммунной клетке по сравнению с исходной молекулой.

45. Выделенное антитело, которое специфически связывается с белком программируемой смерти 1 (PD-1), при этом антитело содержит тяжелую цепь, легкую цепь и Fc-область,
при этом тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи;
при этом легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, и
при этом антитело усиливает взаимодействие PD-1, экспрессируемого на поверхности иммунной клетки, с PD-L1.

46. Антитело по п. 45, при этом Fc-область содержит аминокислотную замену, которая приводит к снижению зависимой от антитела клеточной цитотоксичности (ADCC) против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки у субъекта по сравнению с исходной молекулой, которая не содержит аминокислотную замену, и при этом антитело оказывает тот же или более высокий агонистический эффект на передачу сигналов PD-1 в иммунной клетке по сравнению с исходной молекулой.

47. Антитело по любому из пп. 44–46, при этом переменная область тяжелой цепи содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 1–3, с 0–3 аминокислотными модификациями.

48. Антитело по любому из пп. 44–47, при этом переменная область легкой цепи содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 4–6, с 0–3 аминокислотными модификациями.

49. Антитело по любому из пп. 44–48, при этом Fc-область получена из IgG1 и содержит аспарагиновую кислоту (D) в положении 238, пронумерованном в соответствии с нумерацией EU.

50. Выделенное антитело, которое специфически связывается с белком программируемой смерти 1 (PD-1), при этом антитело содержит тяжелую цепь, легкую цепь и Fc-область,

при этом тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи;

при этом легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, и

где:

(i) переменная область тяжелой цепи содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 1–3, с 0–3 аминокислотными модификациями;

(ii) переменная область легкой цепи содержит CDR, содержащую последовательность, представленную под одним или более из SEQ ID NO: 4–6, с 0–3 аминокислотными модификациями; и

(iii) Fc-область получена из IgG1 и содержит аспарагиновую кислоту (D) в положении 238, пронумерованном в соответствии с нумерацией EU.

51. Антитело по п. 50, при этом антитело усиливает взаимодействие PD-1, экспрессируемого на поверхности иммунной клетки, с PD-L1.
52. Антитело по любому из пп. 45, 46 или 51, при этом взаимодействие между PD-1 и PD-L1 усиливается, что определено в анализе, описанном в примере 10.
53. Антитело по любому из пп. 50–52, при этом антитело индуцирует пониженную зависимую от антитела клеточную цитотоксичность (ADCC) против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки по сравнению с другой той же молекулой, которая содержит Fc-область IgG1, и при этом антитело имеет тот же или более высокий агонистический эффект на передачу сигналов PD-1 в иммунной клетке по сравнению с такой же в остальном молекулой.
54. Антитело по любому из пп. 44, 46 или 53, при этом ADCC против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки снижается, что определено с помощью анализа активации натуральных клеток-киллеров, описанном в примере 7.
55. Антитело по любому из пп. 44, 46, 53 или 54, при этом антитело не приводит к значительной ADCC против экспрессирующей PD-1 регуляторной Т-клетки, что определено с помощью анализа активации натуральных клеток-киллеров, описанном в примере 7.
56. Антитело по любому из пп. 44, 46 или 53–55, при этом антитело не активирует натуральные клетки-киллеры (NK).
57. Антитело по любому из пп. 44–55, при этом переменная область тяжелой цепи содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDRH1), CDRH2 и CDRH3, и при этом CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1–3, соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями.
58. Антитело по любому из пп. 44–57, при этом переменная область легкой цепи содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDRL1), CDRL2 и CDRL3, и при этом CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат последовательность,

представленную под SEQ ID NO: 4–6, соответственно, с 0–3 аминокислотными модификациями.

59. Антитело по любому из пп. 44–58, при этом переменная область тяжелой цепи содержит CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и при этом CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1-3 соответственно.

60. Антитело по любому из пп. 44–59, при этом переменная область легкой цепи содержит CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и при этом CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4–6, соответственно.

61. Антитело по любому из пп. 44–60, при этом переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 7–11.

62. Антитело по любому из пп. 44–61, при этом переменная область легкой цепи содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 12–16.

63. Антитело по любому из пп. 44–62, при этом тяжелая цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 18.

64. Антитело по любому из пп. 44–63, при этом легкая цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 19.

65. Антитело по любому из пп. 44–64, при этом Fc-область получена из IgG1 человека.

66. Антитело по любому из пп. 44–62, при этом Fc-область содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, или 100% идентичности с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 17.

67. Антитело по любому из пп. 44–66, при этом переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи образуют структуру, выбранную из группы, состоящей из scFv, sc(Fv)₂, dsFv, Fab, Fab', (Fab')₂ и димера.
68. Антитело по любому из пп. 44–66, при этом антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, функционально связанную с Fc-областью, и при этом легкая цепь содержит переменную область легкой цепи.
69. Антитело по любому из пп. 44–66, при этом переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи образуют одноцепочечный переменный фрагмент (ScFv), который функционально связан с Fc-областью.
70. Антитело по любому из пп. 44–69, при этом антитело представляет собой гуманизованное антитело.
71. Антитело по любому из пп. 44–69, при этом антитело представляет собой антитело человека.
72. Антитело по любому из пп. 44–69, при этом антитело выбрано из группы, состоящей из антитела человека, гуманизованного антитела, химерного антитела и мультиспецифического антитела.
73. Антитело по любому из пп. 44–72, при этом антитело является моноклональным.
74. Антитело по любому из пп. 44–73, при этом антитело связывается с PD-1 человека с K_D менее 200 нМ, 100 нМ, 80 нМ, 60 нМ или 40 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С.
75. Антитело по любому из пп. 44–73, при этом антитело связывается с PD-1 человека с K_D менее 60 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С.

76. Антитело по любому из пп. 44–73, при этом антитело связывается с PD-1 человека с K_D менее 40 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С.
77. Антитело по любому из пп. 44–76, при этом антитело связывается с PD-1 яванского макака с K_D менее 5000 нМ, 4000 нМ, 2000 нМ, 1000 нМ, 800 нМ, 600 нМ, 500 нМ, 400 нМ, 300 нМ или 200 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С
78. Антитело по любому из пп. 44–76, при этом антитело связывается с PD-1 яванского макака с K_D менее 600 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С.
79. Антитело по любому из пп. 44–76, при этом антитело связывается с PD-1 яванского макака с K_D менее 300 нМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С.
80. Антитело по любому из пп. 44–79, при этом антитело агонизирует PD-1 человека, экспрессируемый на поверхности иммунной клетки.
81. Антитело по п. 80, при этом иммунная клетка представляет собой Т-клетку.
82. Антитело по любому из пп. 44–81, при этом связывание антитела с PD-1 человека, экспрессируемым на поверхности иммунной клетки, снижает пролиферацию клетки по сравнению с сопоставимой иммунной клеткой, не связанной антителом.
83. Антитело по п. 82, при этом клетка представляет собой Т-клетку.
84. Антитело по п. 82 или п. 83, при этом снижение активации клеток измеряется с помощью анализа NFAT-репортера, описанного в примере 4.
85. Антитело по п. 82 или п. 83, при этом снижение активации клеток измеряется с помощью анализа активации столбнячным анатоксином или анализа активации вирусным пептидом, описанных в примере 5.

86. Антитело по п. 82 или п. 83, при этом снижение пролиферации клеток измеряется с помощью анализа активации антителом к CD3/28, описанного в примере 6.
87. Антитело по п. 82 или п. 83, при этом снижение пролиферации клеток измеряется, когда иммунная клетка находится в непосредственной близости от клеток, экспрессирующих PD-L1.
88. Антитело по п. 87, при этом снижение пролиферации клеток измеряется с помощью анализа, описанного в примере 8.
89. Антитело по п. 82 или п. 83, при этом снижение пролиферации клеток измеряется *in vitro* или *in vivo*.
90. Антитело по любому из пп. 82–89, при этом снижение пролиферации клеток составляет по меньшей мере около 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% или 50%.
91. Антитело по любому из пп. 82–89, при этом снижение пролиферации клеток составляет от около 10% до 50%, от 10% до 40%, от 10% до 30%, от 10% до 20%, от 10% до 15%, от 20% до 50%, от 20% до 40% или от 20% до 30%.
92. Антитело по любому из пп. 44–91, при этом Fc-область селективно связывается с FcγR2B.
93. Антитело по п. 92, при этом антитело связывается с FcγR2B человека с K_D менее 5 мкМ, 4 мкМ, 3 мкМ или 2 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С.
94. Антитело по п. 92 или п. 93, при этом антитело связывается с FcγR2B человека с K_D по меньшей мере 2 мкМ, 1 мкМ, 800 нМ, 600 нМ, 500 нМ, 400 нМ, 300 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 80 нМ, 60 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ или 5 нМ.
95. Антитело по п. 92, при этом антитело связывается с FcγR2B человека с K_D от 200 нМ до 5 мкМ, от 400 нМ до 4 мкМ, от 500 нМ до 3,5 мкМ, от 800 нМ до 3 мкМ, от 1 мкМ до 5 мкМ, от 1 мкМ до 4,5 мкМ, от 1 мкМ до 4 мкМ, от 1 мкМ до 3,5 мкМ, от 1 мкМ до 3 мкМ, от 1 мкМ до 2,5 мкМ или от 1 мкМ до 2 мкМ.

96. Антитело по любому из пп. 92–95, при этом антитело связывается с FcγR2A человека (аллотип 131R) с K_D более 5 мкМ или 10 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С.
97. Антитело по любому из пп. 92–95, при этом антитело связывается с FcγR2A человека (аллотип 131R) с K_D по меньшей мере 15 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С.
98. Антитело по любому из пп. 92–97, при этом антитело связывается с FcγR2A человека (аллотип 131H) с K_D по меньшей мере 50 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С.
99. Антитело по любому из пп. 92–97, при этом антитело связывается с FcγR2A человека (аллотип 131H) с K_D по меньшей мере 80 мкМ, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37 °С.
100. Антитело по любому из пп. 92–99, при этом соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131R) составляет по меньшей мере 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 или 6:1.
101. Антитело по любому из пп. 92–99, при этом соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131R) составляет по меньшей мере 6:1.
102. Антитело по любому из пп. 92–99, при этом соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131R) составляет около 6:1.
103. Антитело по любому из пп. 92–102, при этом соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131H) составляет по меньшей мере 10:1, 15:1, 20:1, 40:1 или 50:1.

104. Антитело по любому из пп. 92–102, при этом соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131H) составляет по меньшей мере 40:1.
105. Антитело по любому из пп. 92–102, при этом соотношение аффинности связывания антитела с FcγR2B человека и аффинности связывания антитела с FcγR2A человека (аллотип 131H) составляет около 40:1.
106. Антитело по любому из пп. 100–105, при этом соотношение определяется поверхностным плазмонным резонансом при 37 °C.
107. Выделенная нуклеиновая кислота, которая содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептиды, способные образовывать антитело по любому из пп. 44–106.
108. Вектор, который содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептиды, способные образовывать антитело по любому из пп. 44–106.
109. Клетка-хозяин, содержащая одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих аминокислотную последовательность тяжелой цепи и легкой цепи, которые при экспрессии способны комбинироваться с образованием антитела по любому из пп. 44–106.
110. Способ, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 109 в условиях продуцирования антитела.
111. Способ, включающий
- (а) обеспечение клетки-хозяина, содержащей одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих аминокислотную последовательность тяжелой цепи и легкой цепи, которые при экспрессии способны образовывать антитело по любому из пп. 44–106;
 - (б) культивирование клетки-хозяина, экспрессирующей кодируемую аминокислотную последовательность; и
 - (с) выделение антитела.

112. Иммуноконъюгат, содержащий антитело по любому из пп. 44–106, конъюгированное с агентом.
113. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество антитела по любому из пп. 44–106 или иммуноконъюгата по п. 112 и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.
114. Фармацевтическая композиция для применения в лечении заболевания или состояния, содержащая терапевтически эффективное количество антитела по любому из пп. 44–106 или иммуноконъюгата по п. 112 и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.
115. Набор, содержащий антитело по любому из пп. 44–106 или иммуноконъюгат по п. 112 в контейнере.
116. Набор по п. 115, дополнительно содержащий информационный материал, содержащий инструкции по применению антитела по любому из пп. 44–106 или иммуноконъюгата по п. 112.
117. Способ лечения заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп. 44–106 или иммуноконъюгата по п. 112 или введение субъекту фармацевтической композиции по п. 113.
118. Способ по п. 117, в котором заболевание или состояние включает заболевание или состояние, связанное с PD-1.
119. Способ по п. 117 или п. 118, в котором заболевание или состояние включает острый рассеянный энцефаломиелит (ADEM), болезнь Аддисона, аллергию, очаговую алопецию, боковой амиотрофический склероз, ANCA-ассоциированный васкулит, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, астму, атопический дерматит, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунный полиэндокринный синдром, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, церебральную малярию, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, целиакию, болезнь Крона, синдром Кушинга,

герпетиформный дерматит, дерматомиозит, сахарный диабет 1 типа, эозинофильный гранулематоз с полиангиитом, заболевание желчного пузыря, болезнь «трансплантат против хозяина», болезнь Грейвса, синдром Гийена – Барре, тиреоидит Хашимото, гнойный гидраденит, связанное с IgG4 заболевание, воспалительное заболевание кишечника (IBD), воспалительный фиброз, синдром раздраженного кишечника, ювенильный артрит, болезнь Кавасаки, лейкоз, волчаночный нефрит, артрит Лайма, лимфому, лимфопролиферативные нарушения, менингоэнцефалит, рассеянный склероз, миастению гравис, миелому, нерадиографический аксиальный спондилоартрит (nr-AxSpA), нейромиеелит зрительного нерва, остеоартрит, воспалительные заболевания органов малого таза, пемфигус, перитонит, пилонидальное заболевание, полимиозит, первичный билиарный холангит, первичный склерозирующий холангит, псориаз, псориазический артрит, ревматоидный артрит, саркоидоз, синдром Шегрена, системную красную волчанку, системный склероз, артериит Такаясу, височный артериит, отторжение трансплантата, поперечный миелит, язвенный колит, увеит, васкулит, витилиго и болезнь Вогта – Коянаги – Гарада.

120. Способ по любому из пп. 117–119, в котором субъект представляет собой субъекта-человека.

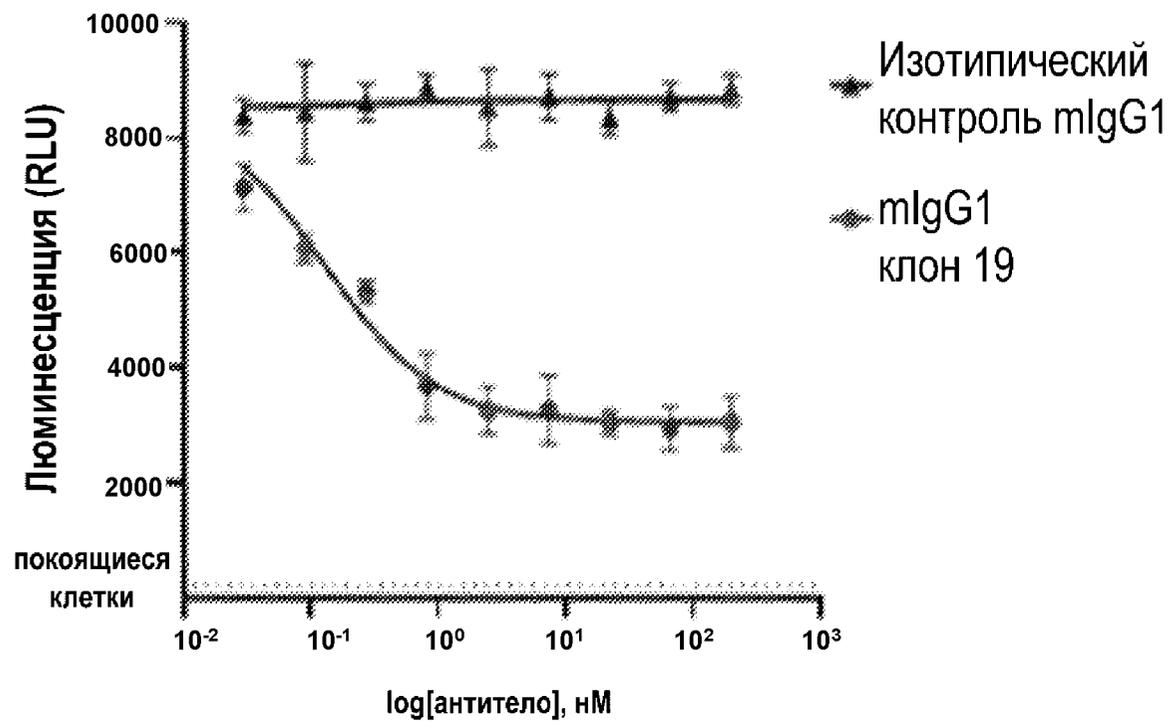
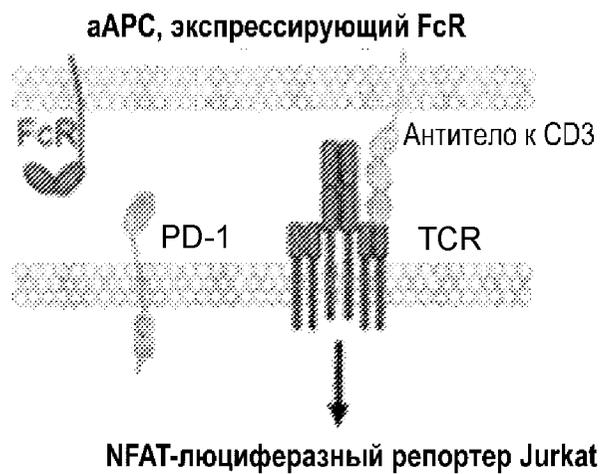
121. Способ понижения регуляции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту антитела по любому из пп. 44–106, введение субъекту иммуноконъюгата по п. 112 или введение субъекту фармацевтической композиции по п. 113.

122. Способ подавления иммунной клетки, экспрессирующей PD-1, включающий приведение иммунной клетки в контакт с антителом по любому из пп. 44–106 или иммуноконъюгатом по п. 112.

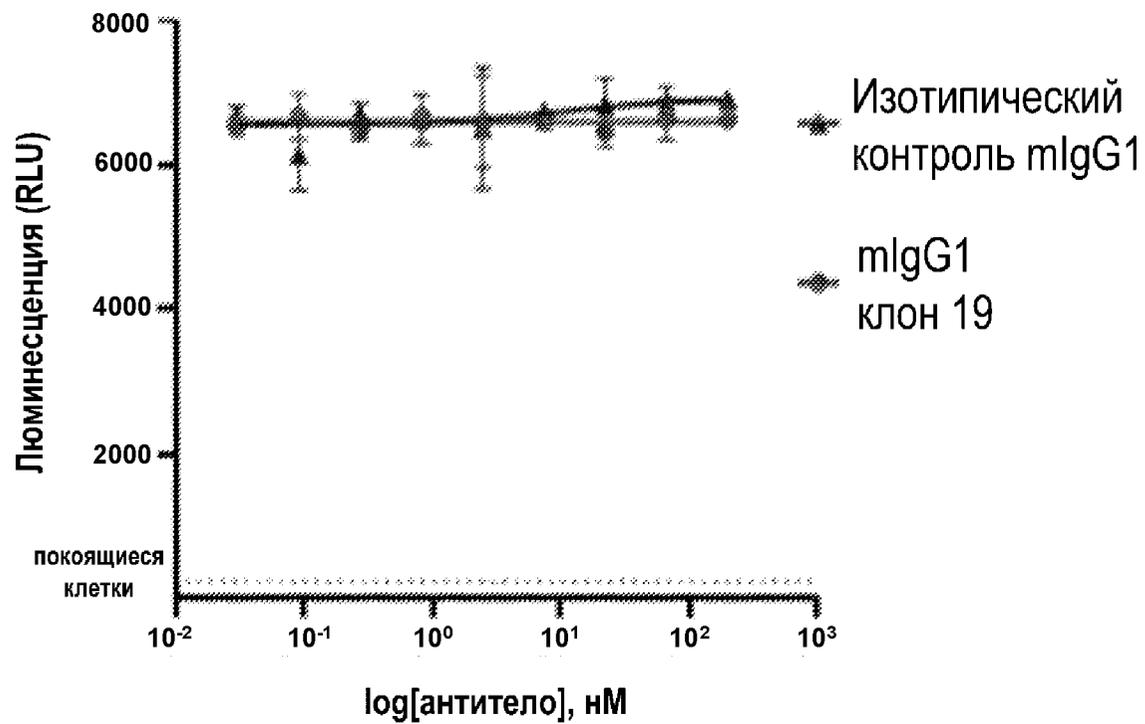
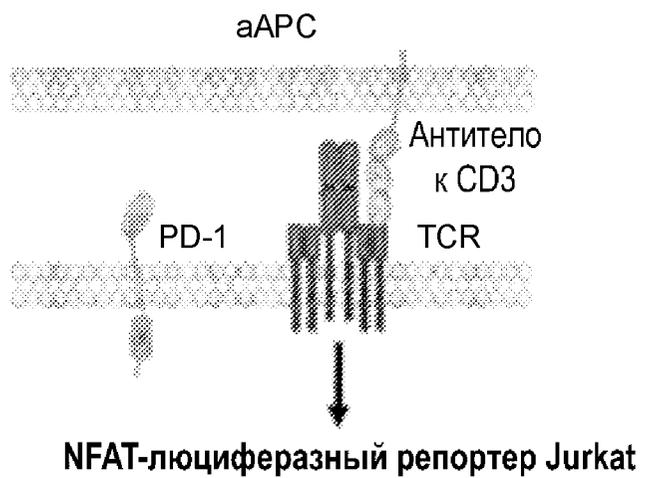
123. Способ по п. 122, в котором иммунная клетка включает Т-клетку, В-клетку или макрофаг.

124. Способ по п. 122, в котором иммунная клетка включает антигенспецифическую Т-клетку.

125. Способ по любому из пп. 122–124, в котором субъект представляет собой субъекта-человека.

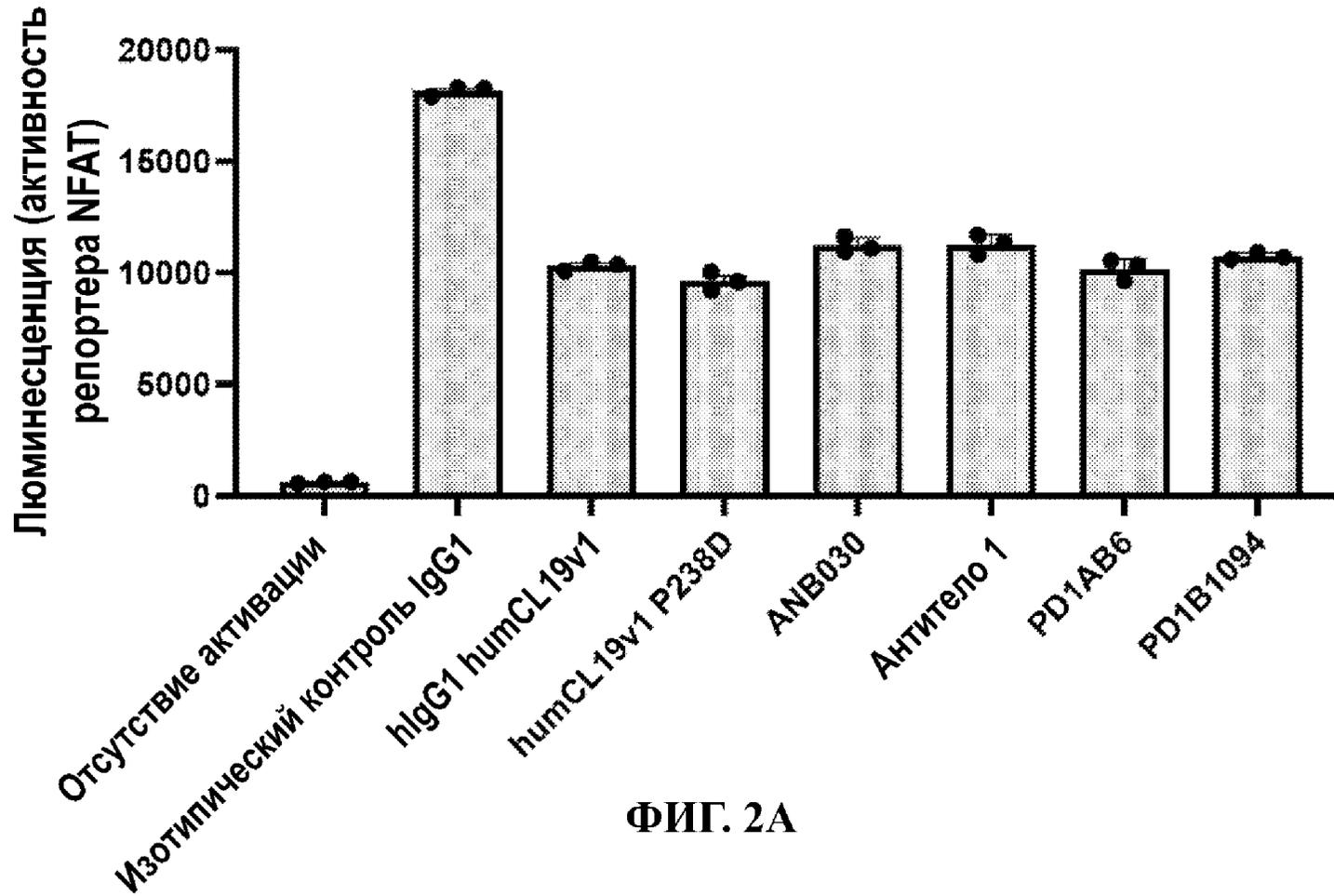


ФИГ. 1А



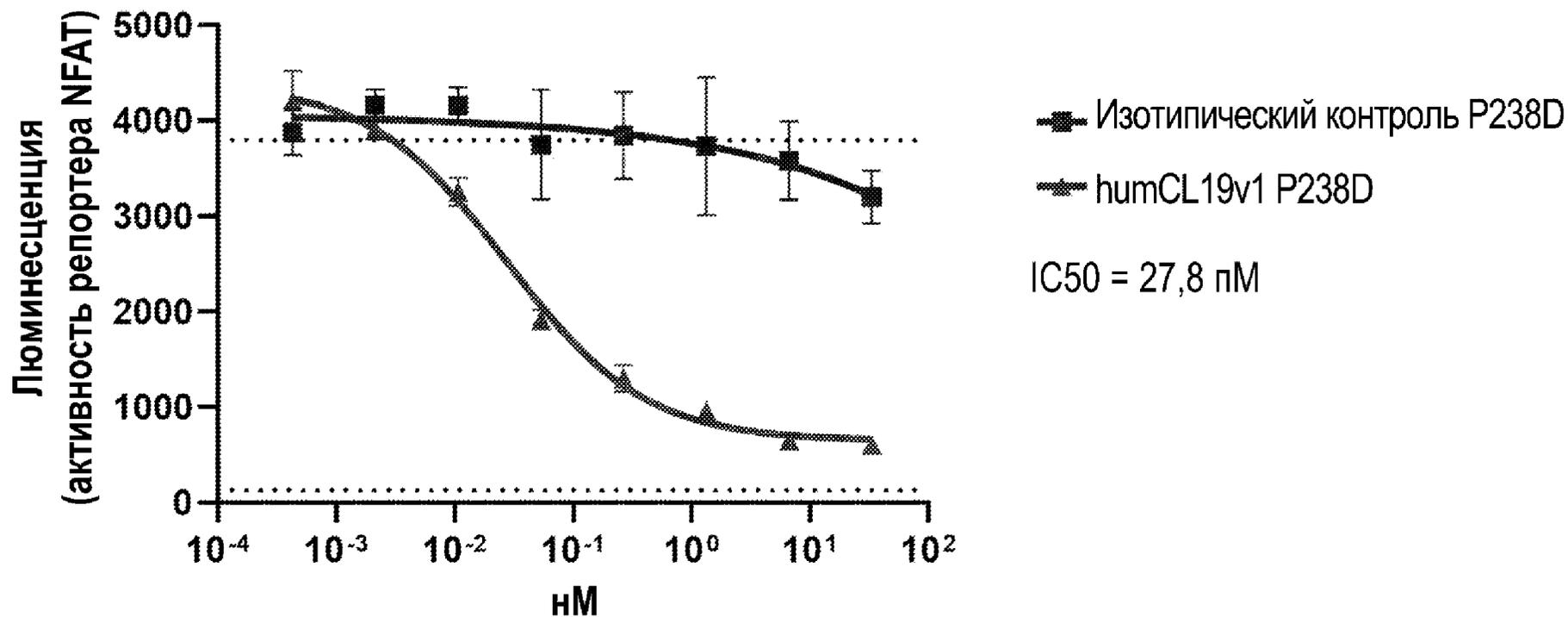
ФИГ. 1В

Ингибирование сигнала NFAT в анализе репортера Jurkat
агонистами PD-1 изотипа человека

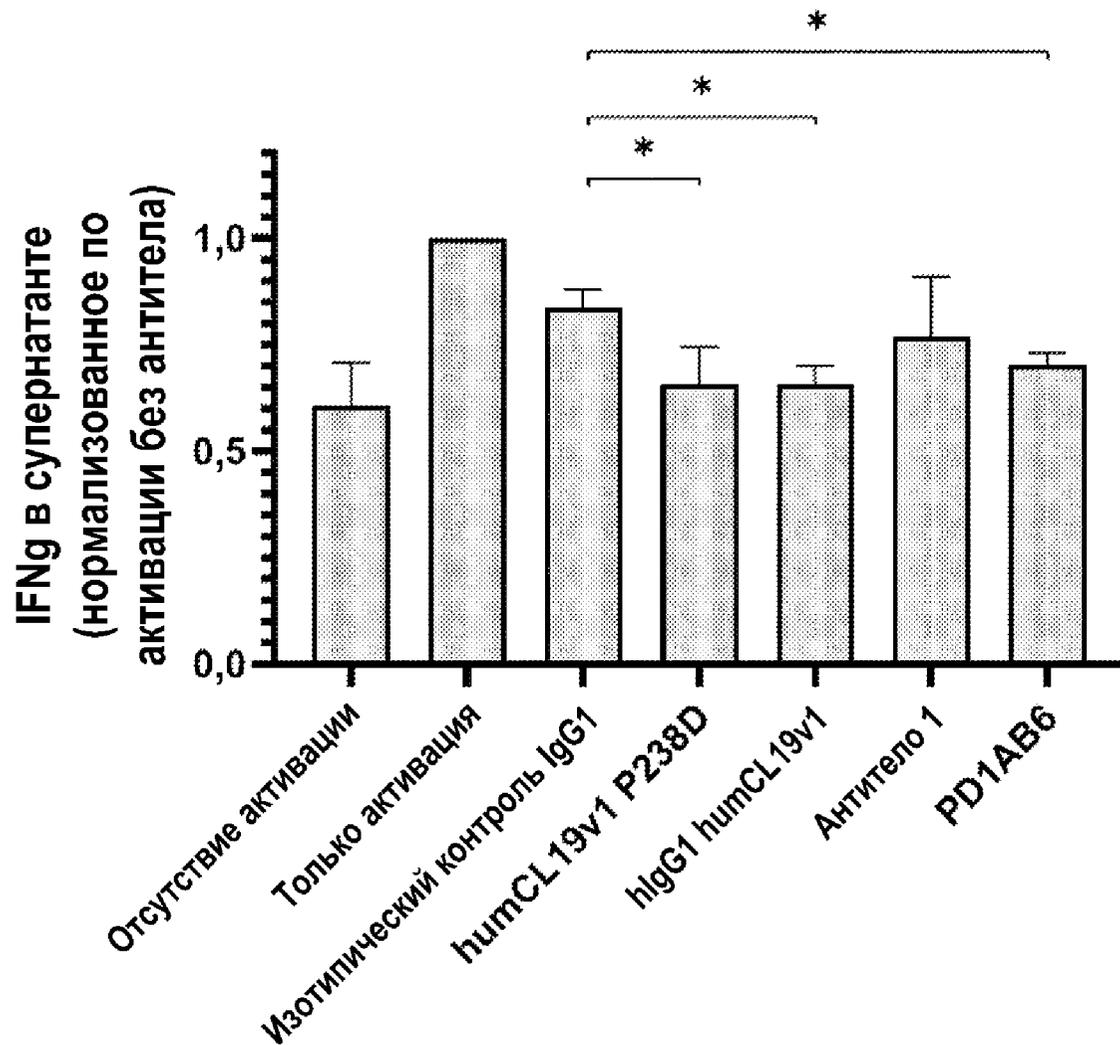


ФИГ. 2А

Репортер NFAT Jurkat со
стимуляторными клетками HEK293

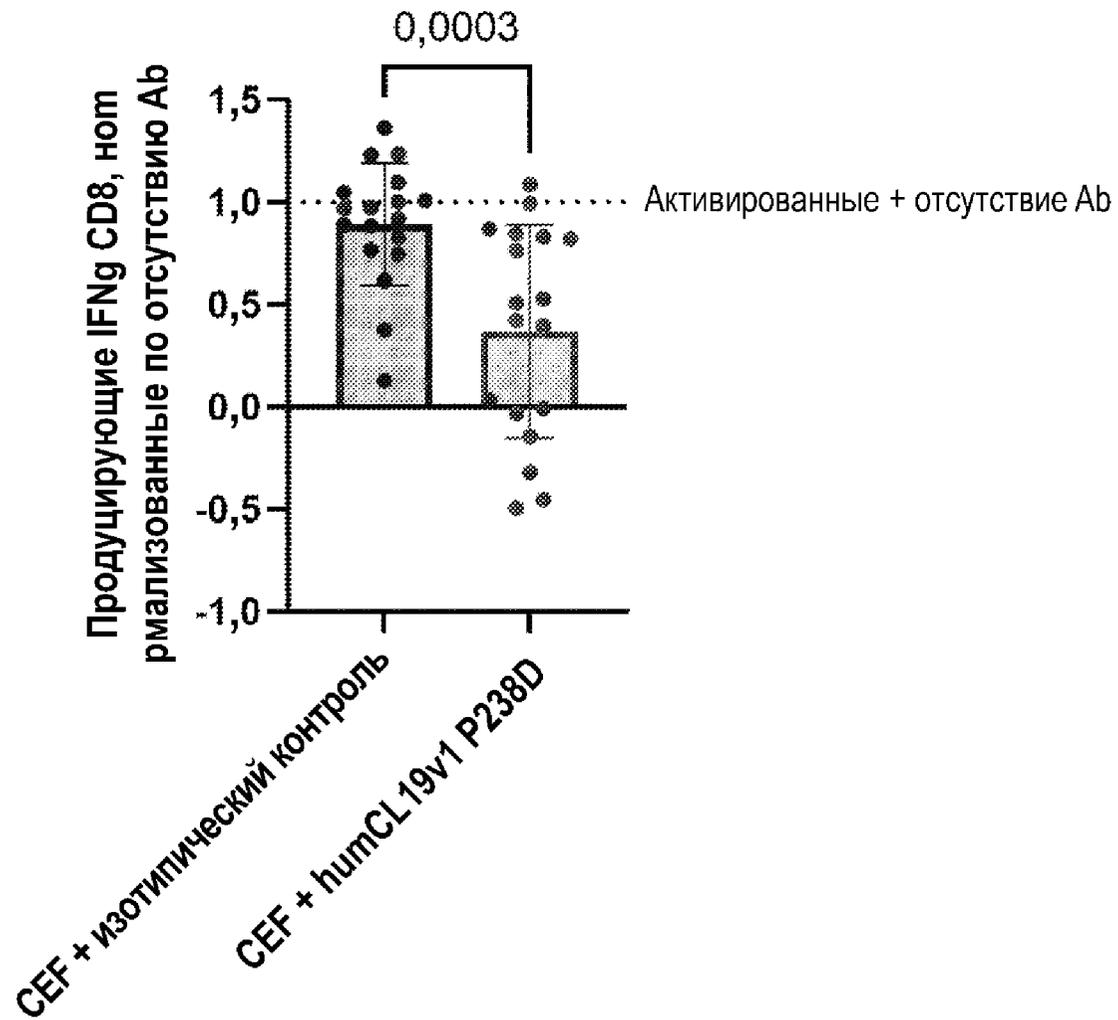


ФИГ. 2В

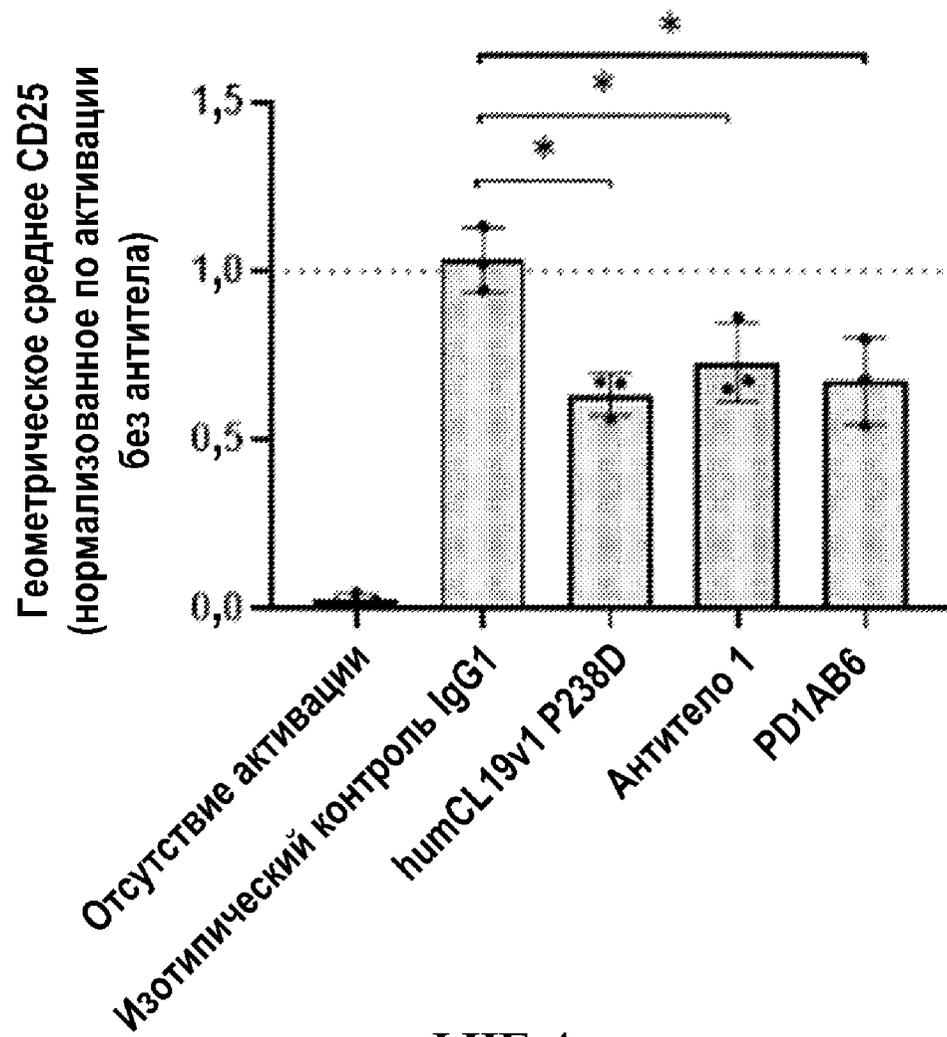


ФИГ. 3А

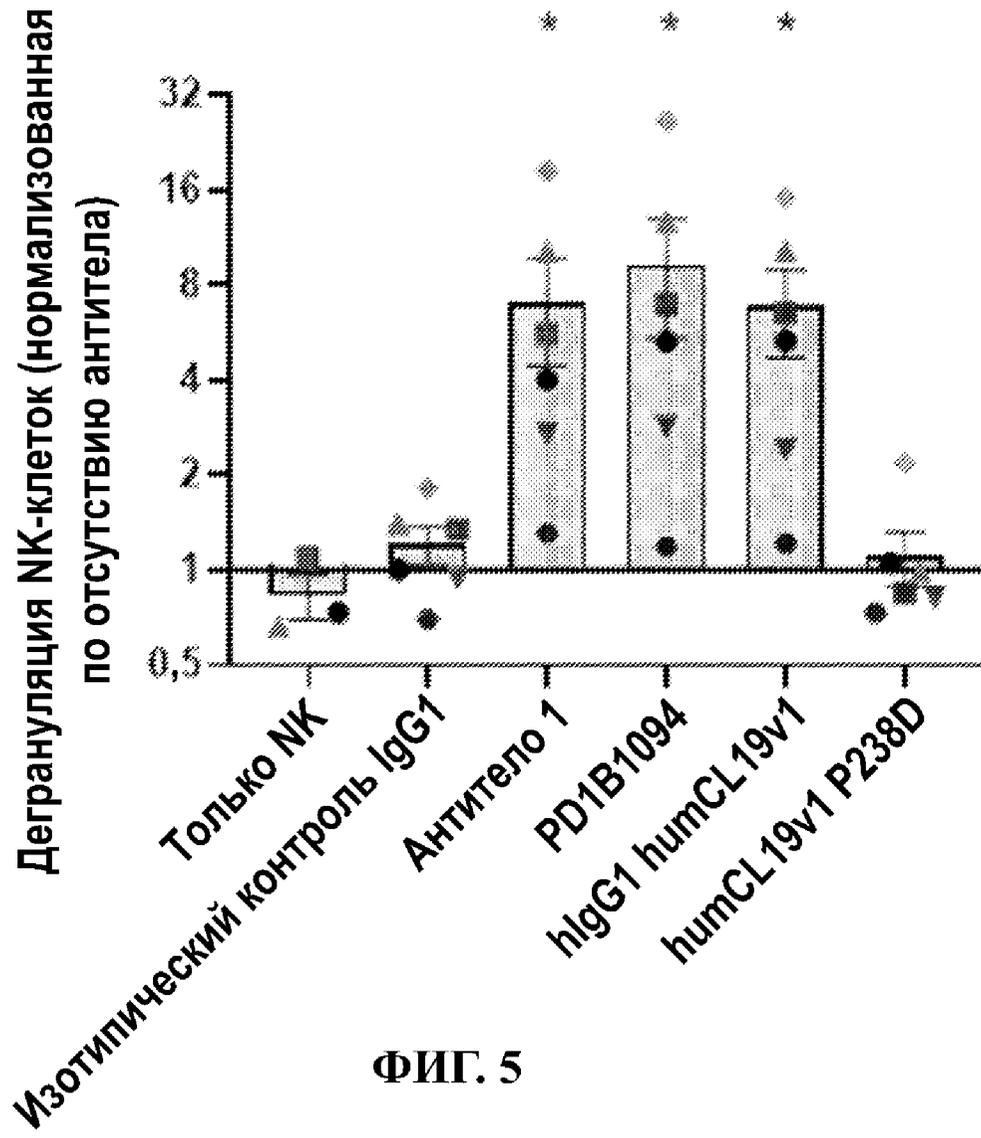
CD8 T-клетки, продуцирующие IFN γ , в ответ на вирусные пептиды

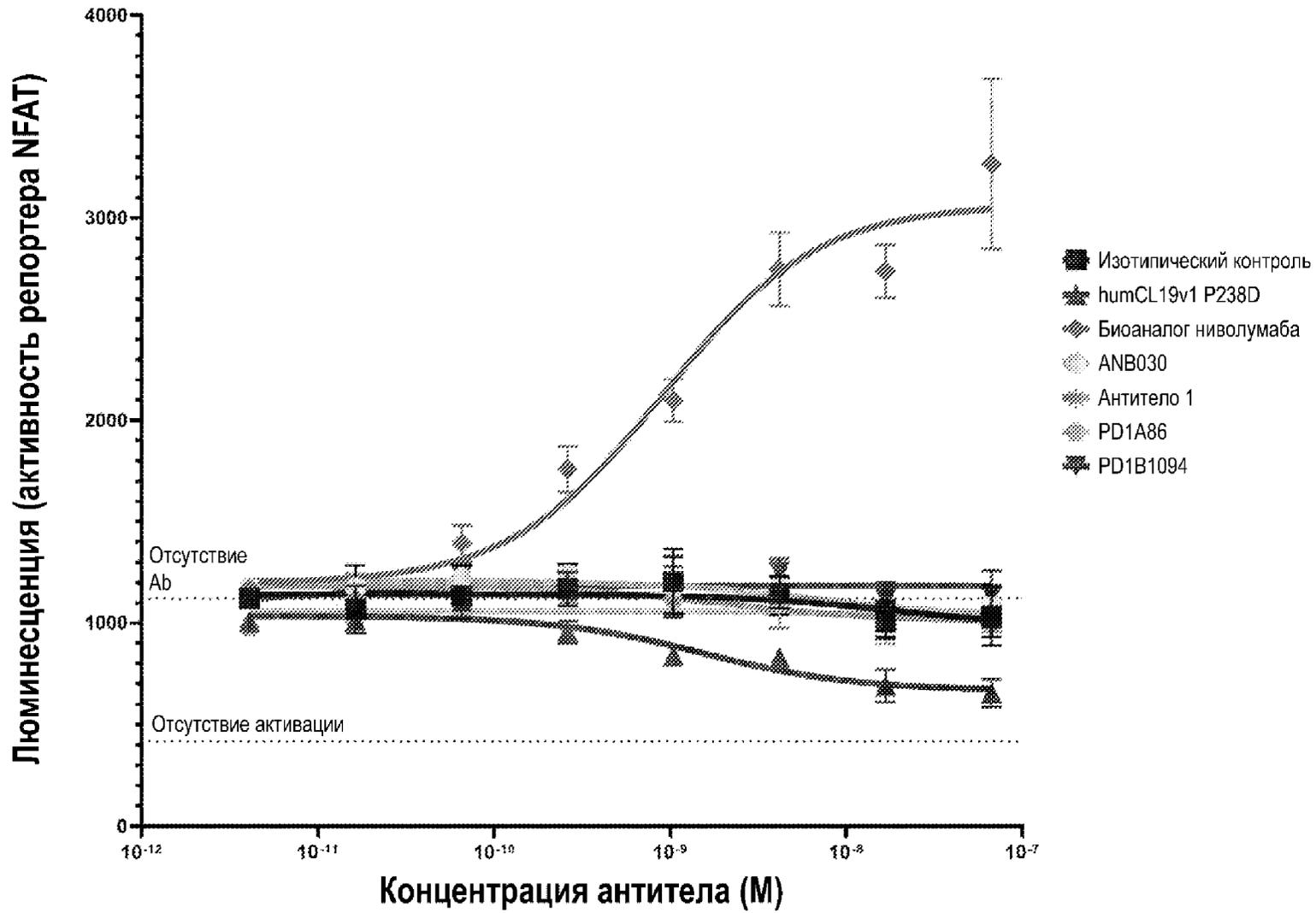


ФИГ. 3В

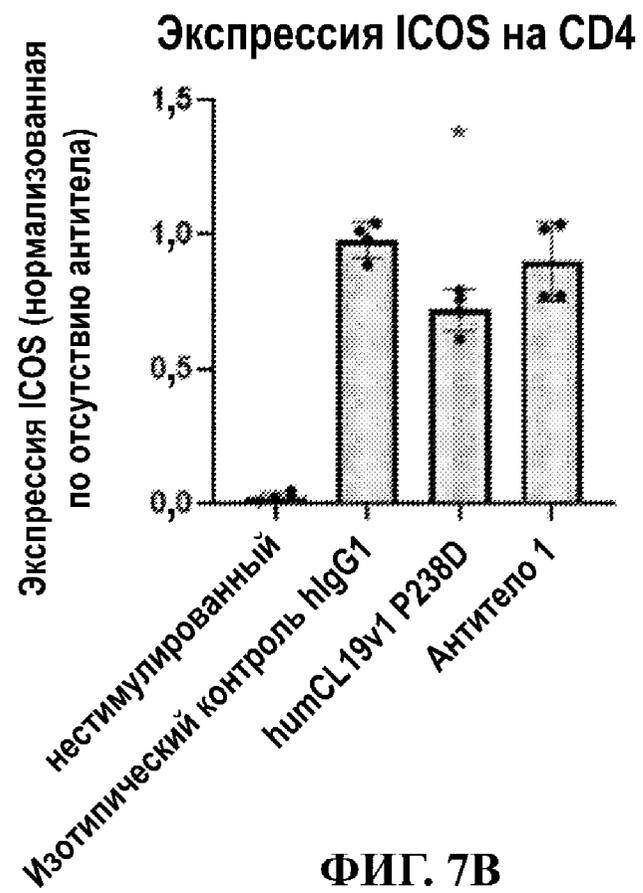
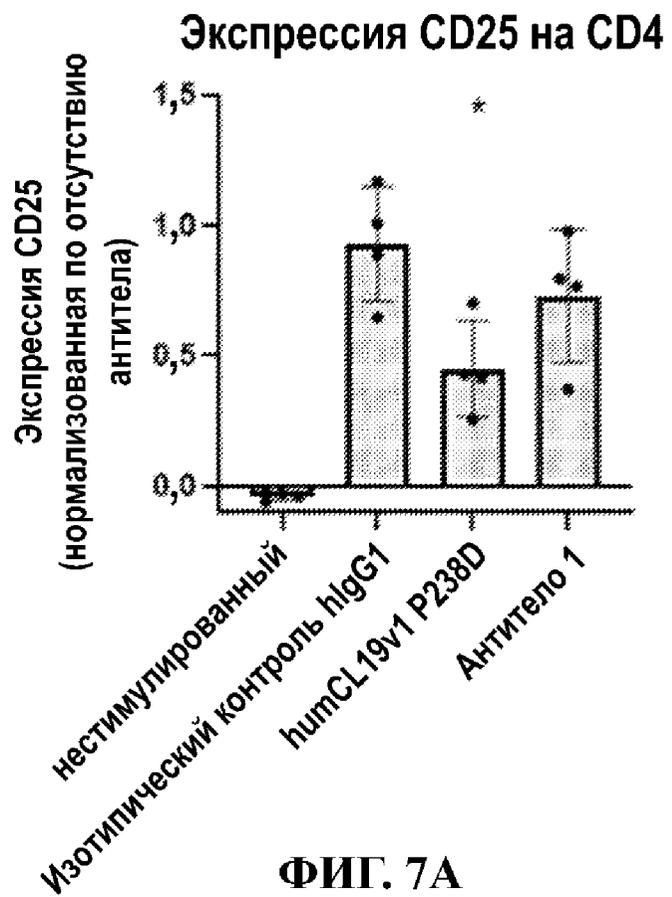


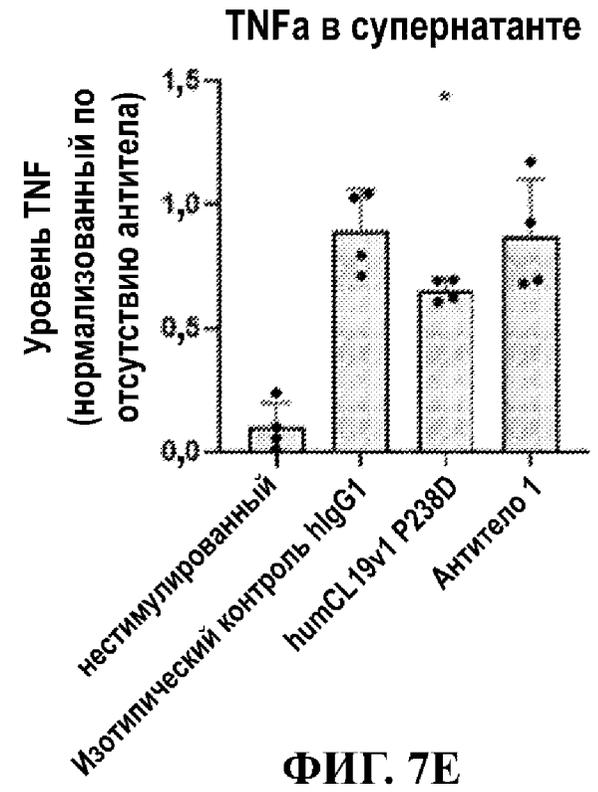
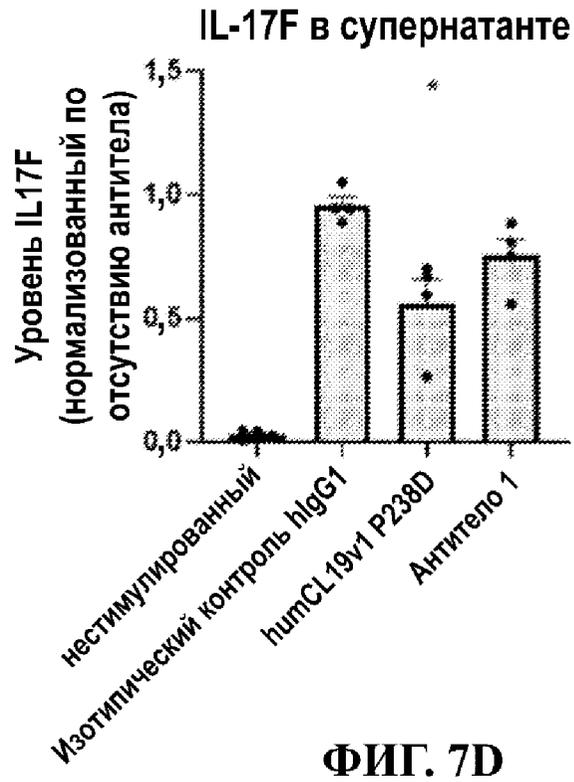
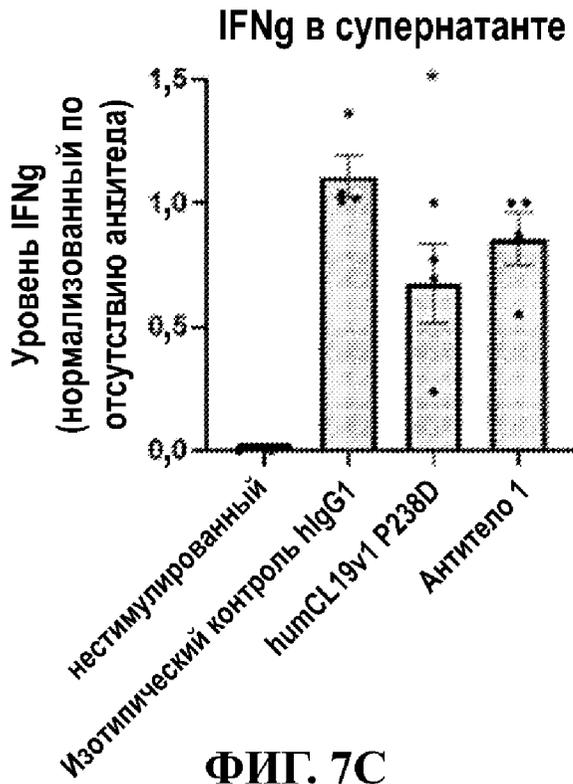
ФИГ. 4



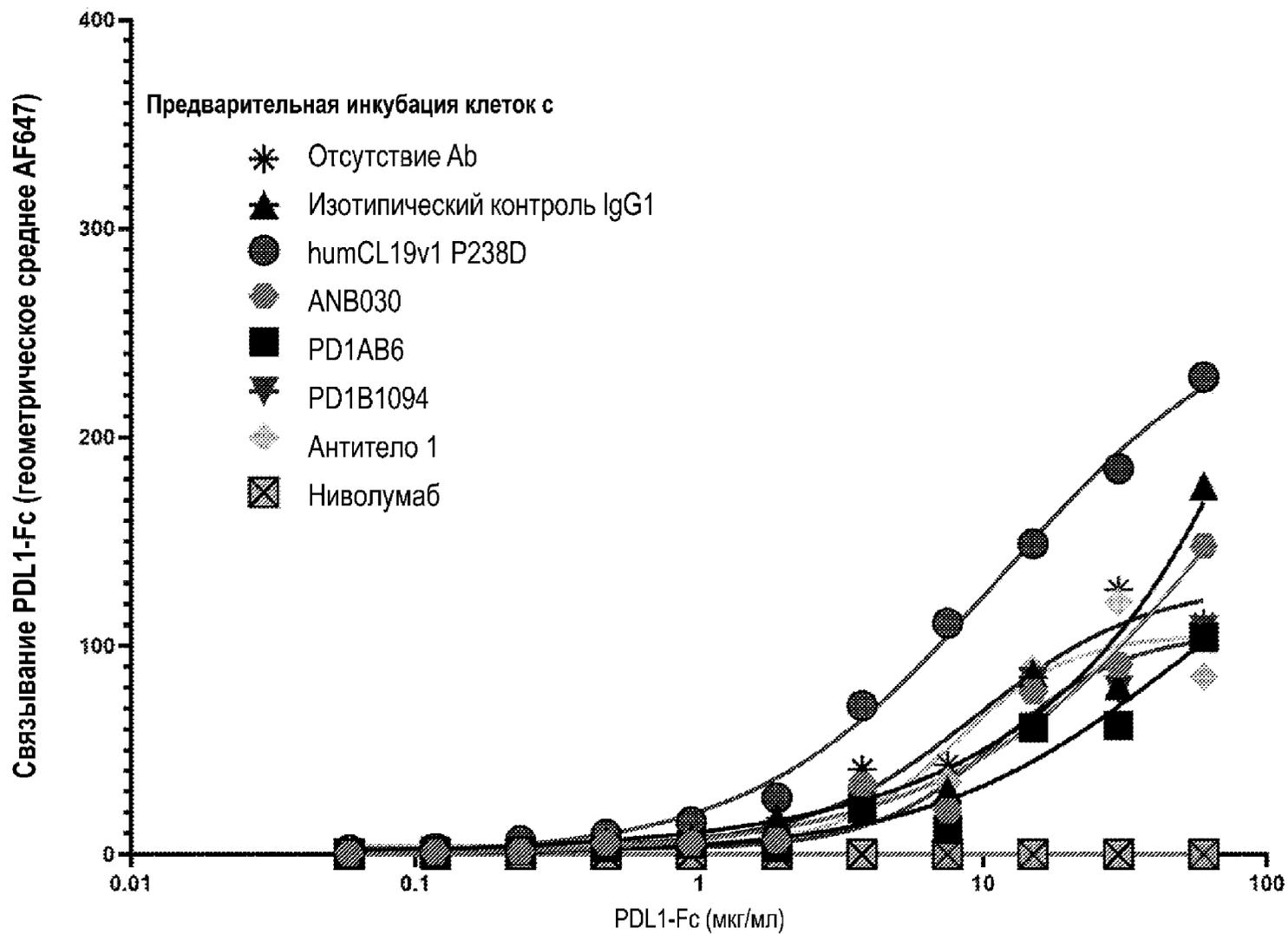


ФИГ. 6

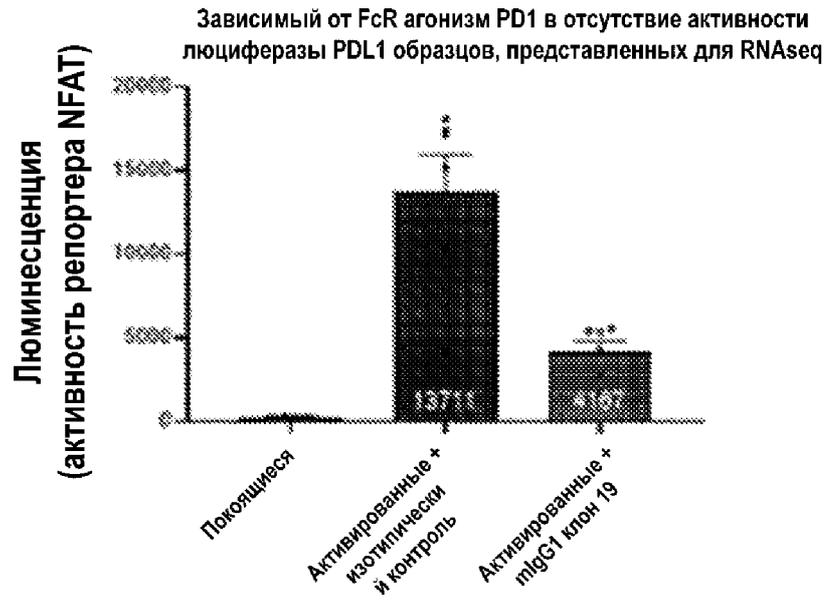




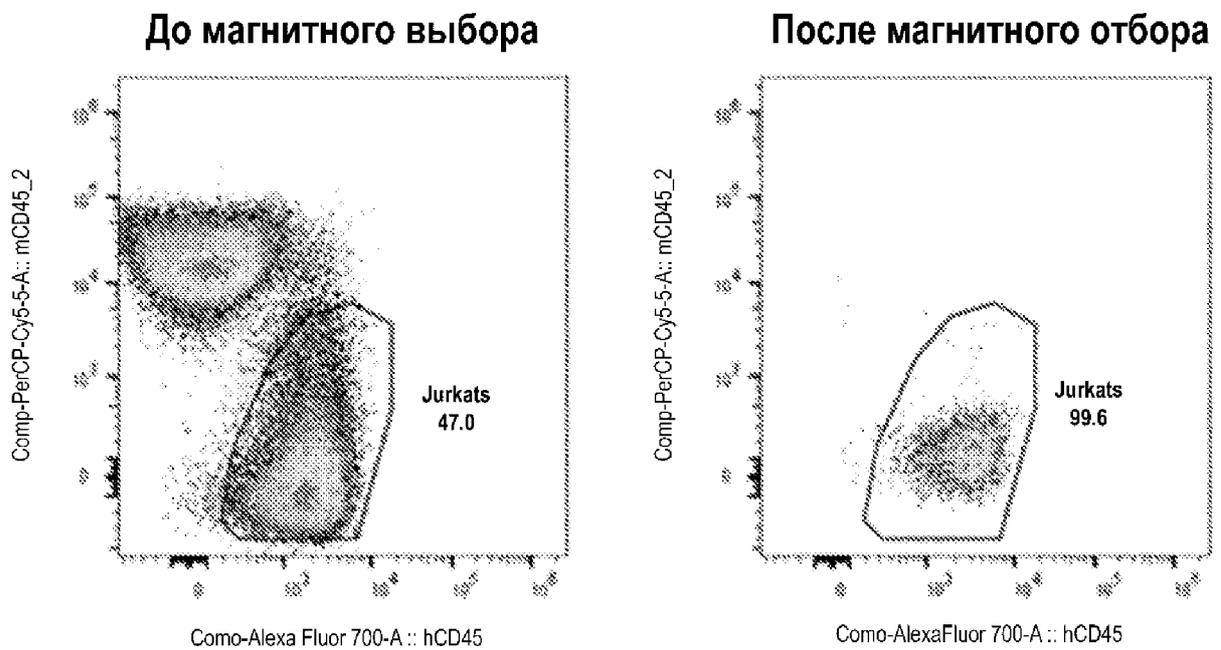
Связывание PDL1-Fc с PD1 Jurkat



ФИГ. 8

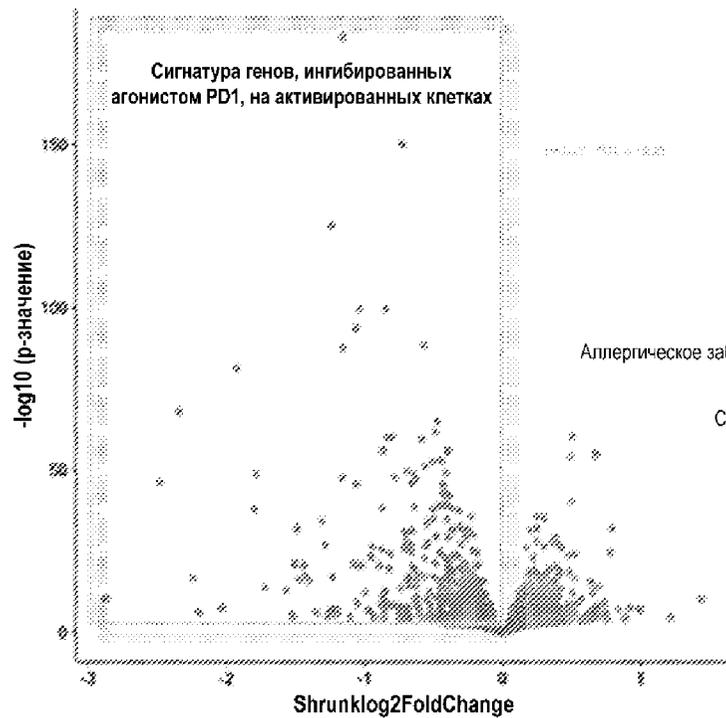


ФИГ. 9А



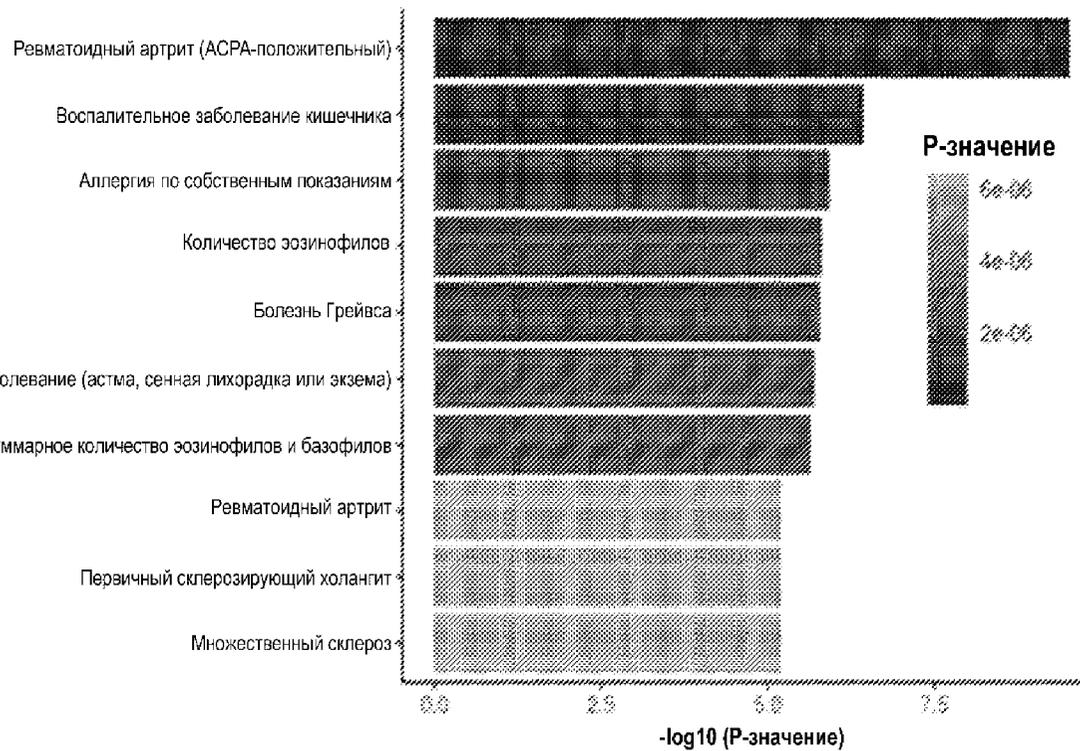
ФИГ. 9В

Стимулированные PD1 репортерные клетки с агонистом PD1 против изотипического контроля

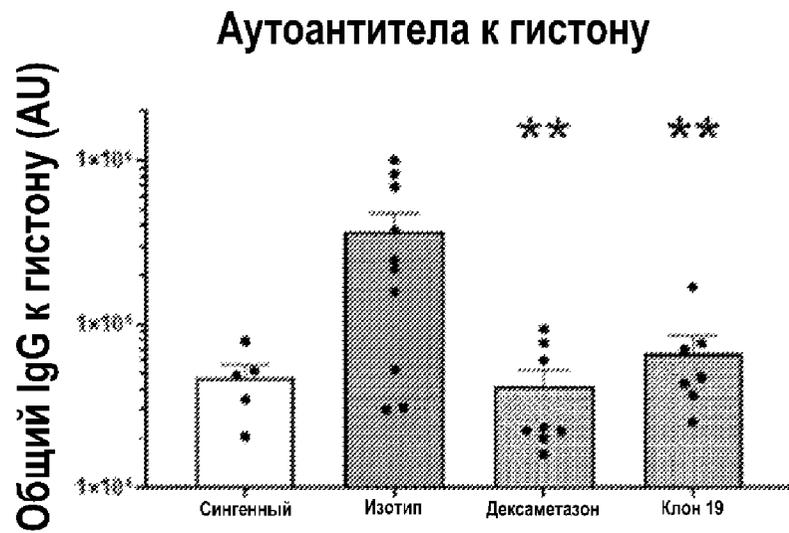


ФИГ. 9С

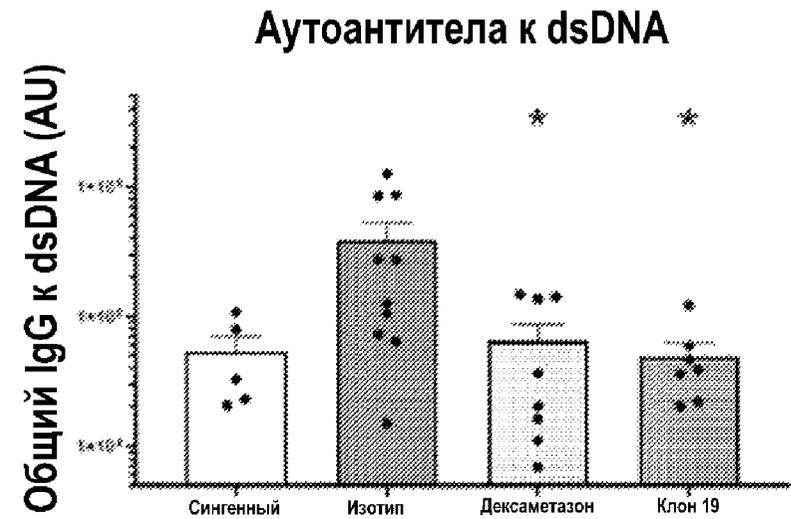
Признаки из каталога BI GWAS, обогащенные сигнатурой агониста PD1



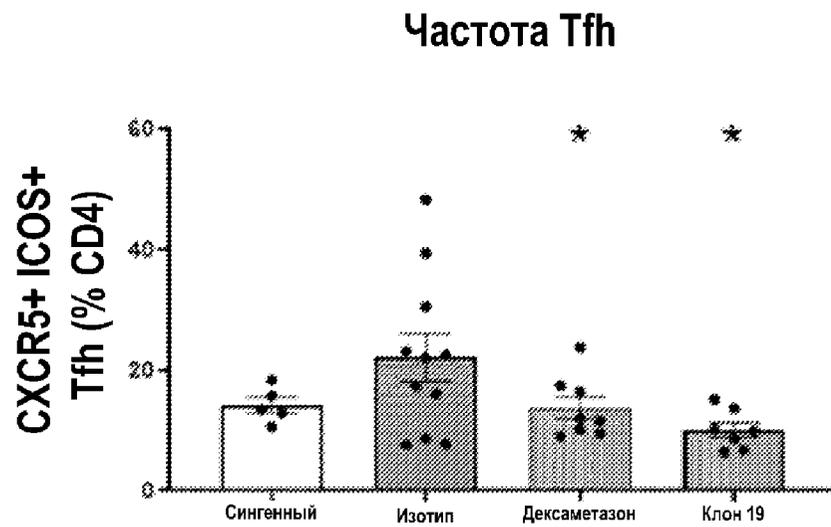
ФИГ. 9D



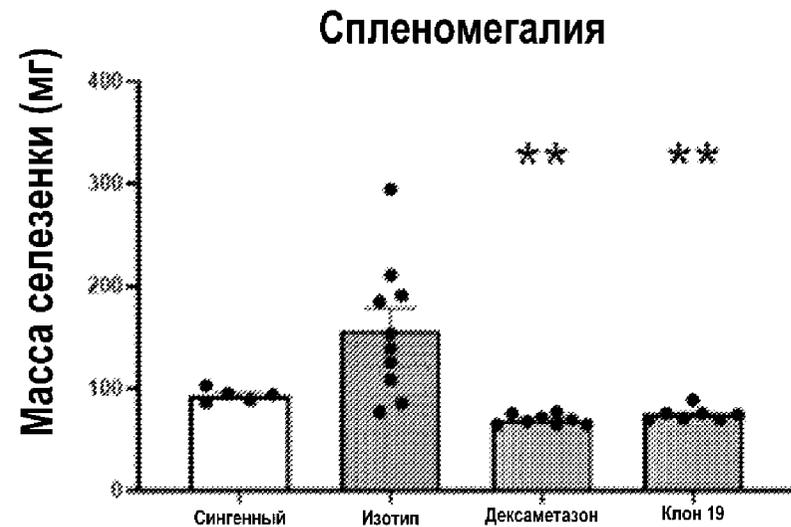
ФИГ. 10А



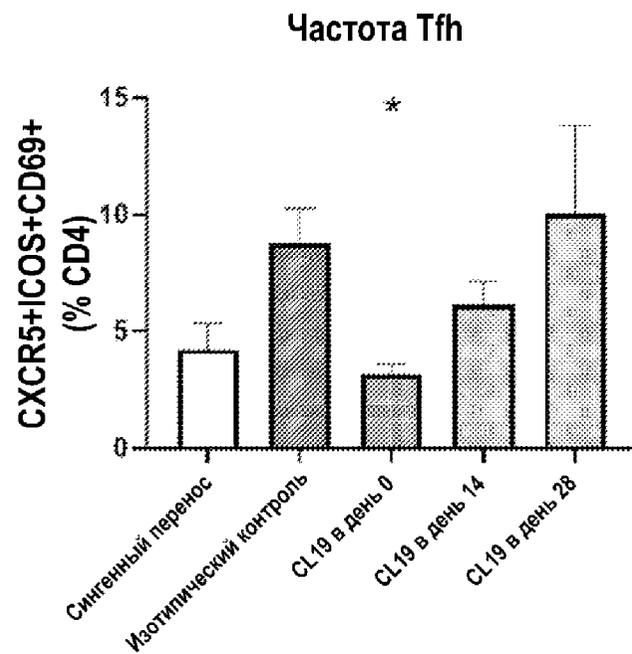
ФИГ. 10В



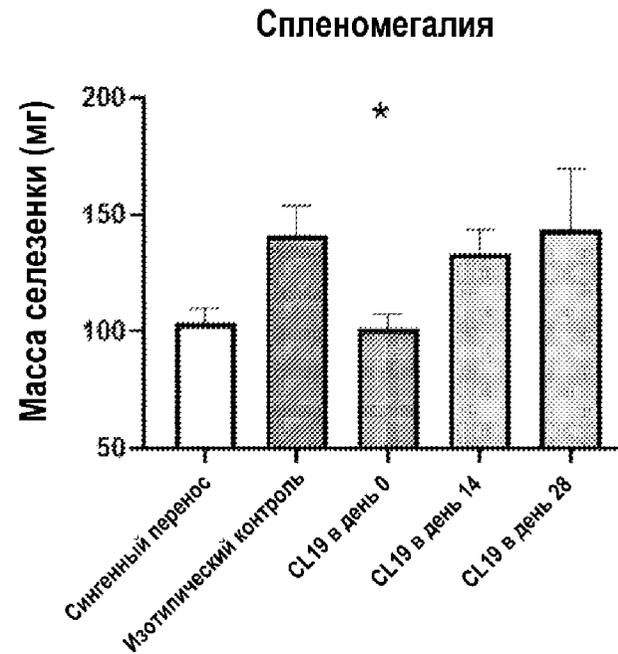
ФИГ. 10С



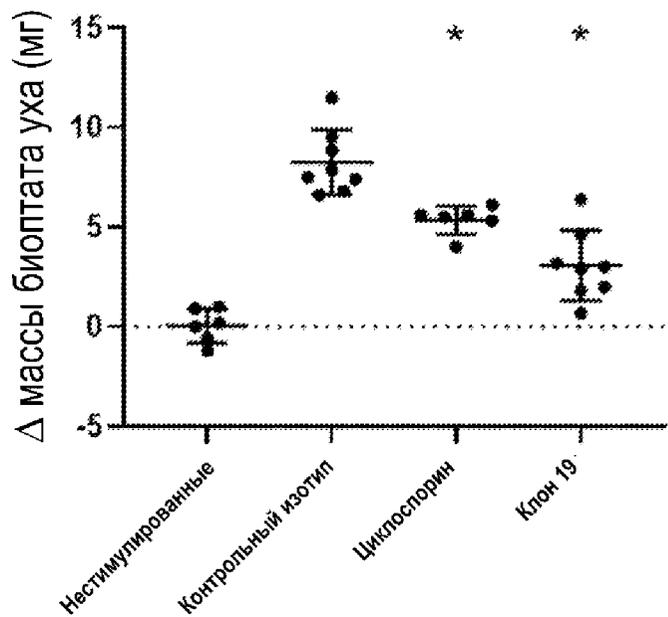
ФИГ. 10D



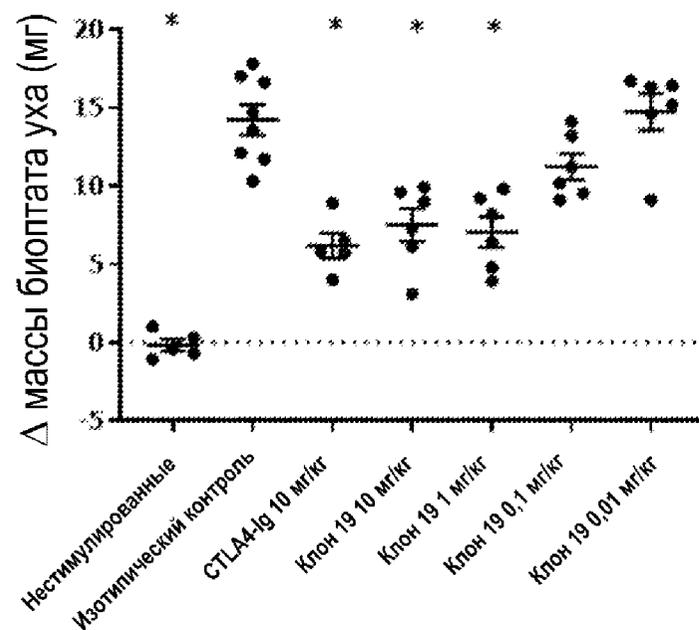
ФИГ. 11А



ФИГ. 11В

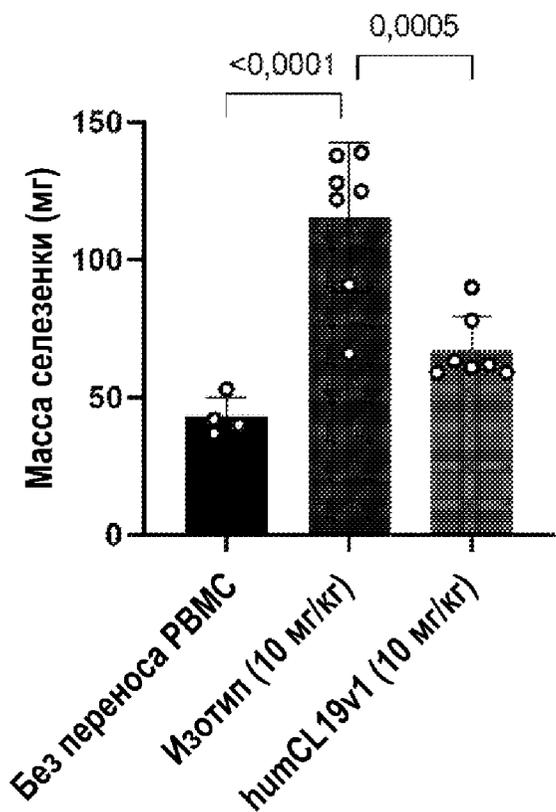


ФИГ. 12А



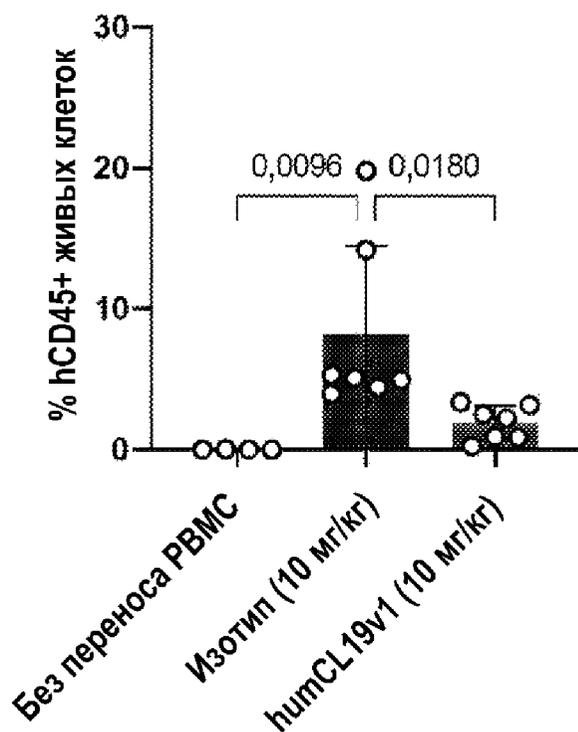
ФИГ. 12В

Масса селезенки в день 28



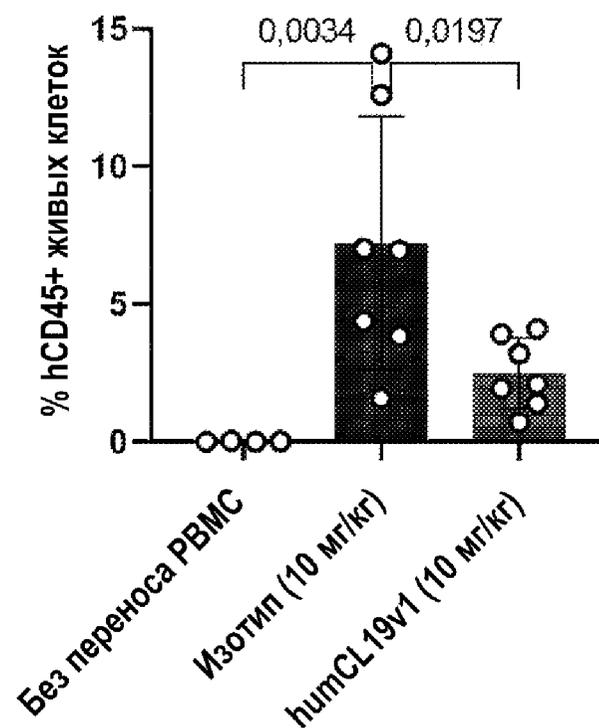
ФИГ. 13А

Клетки селезенки hCD45



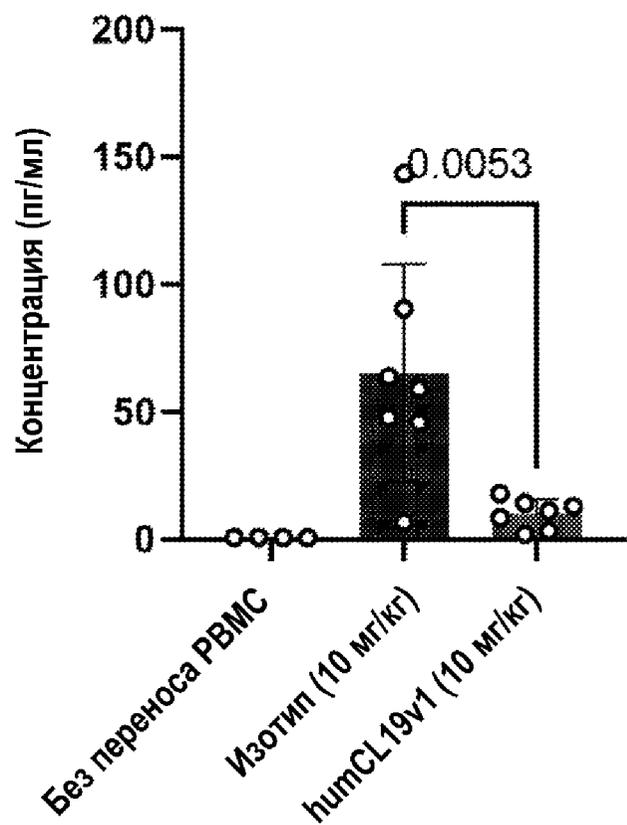
ФИГ. 13В

hCD45 клетки печени

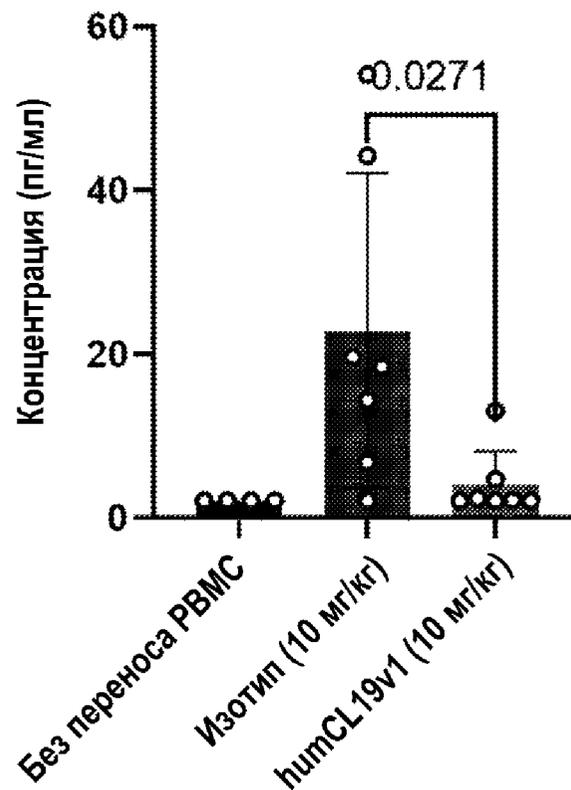


ФИГ. 13С

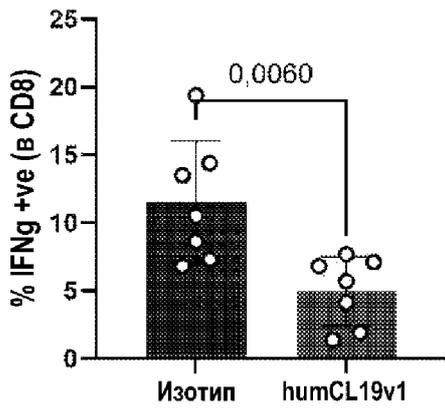
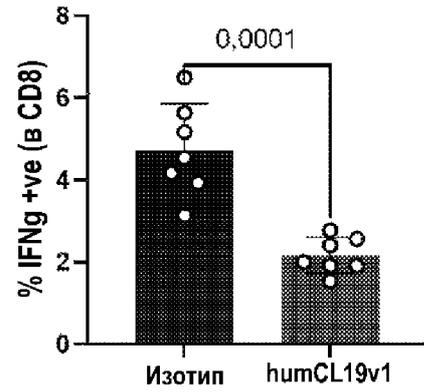
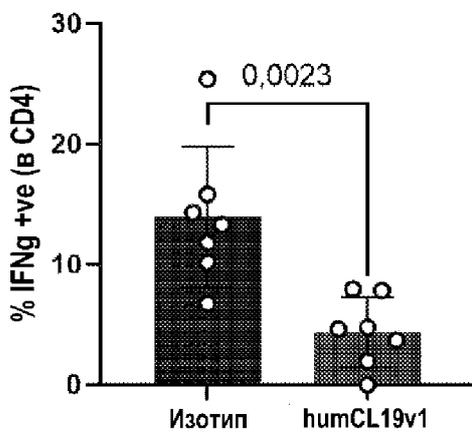
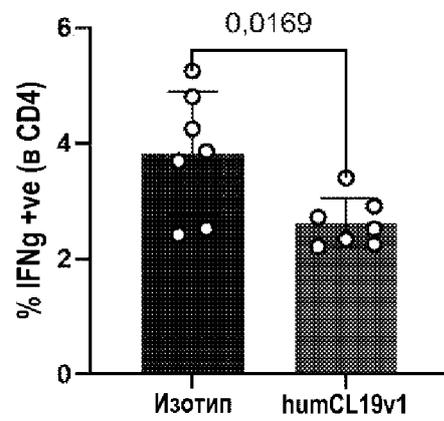
IL6 в сыворотке в день 28



TNFa в сыворотке в день 28



Фиг. 13D

Окрашивание селезенки CD8 IFN γ Окрашивание CD8 IFN γ печениОкрашивание селезенки CD4 IFN γ Окрашивание CD4 IFN γ печени

ФИГ. 13Е