

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201691225 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2016.09.30

(22) Дата подачи заявки  
2014.11.14

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)  
C12N 15/13 (2006.01)  
C12N 15/70 (2006.01)  
C12N 15/81 (2006.01)  
C12N 1/21 (2006.01)  
C12N 1/19 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛО К PD-1, ЕГО АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ И ИХ МЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 201310681942.6

(32) 2013.12.12

(33) CN

(86) PCT/CN2014/091090

(87) WO 2015/085847 2015.06.18

(71) Заявитель:

ШАНХАЙ ХЭНЖУЙ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД.;  
ЦЗЯНСУ ХЭНЖУЙ МЕДСИН КО.,  
ЛТД. (CN)

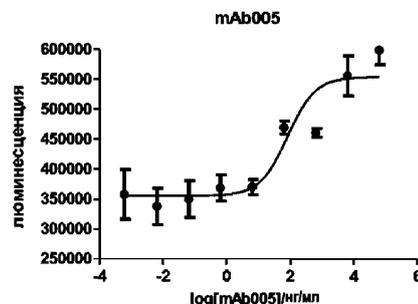
(72) Изобретатель:

Юань Цицизюнь, Цюй Сяндун, Линь  
Цзюйфан, Е Синь, Цао Гуоцин, Тао  
Вейкан, Чжан Ляньшань, Чжан Лей,  
Ян Ли (CN)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложено человеческое антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент и их медицинское применение, и дополнительно предложено химерное антитело и гуманизированные антитела, содержащие область, определяющую комплементарность (CDR) антитела, фармацевтическая композиция, содержащая человеческое антитело к PD-1 и его антигенсвязывающий фрагмент, и применение антитела при получении лекарственных средств для лечения заболеваний или расстройств.



A1

201691225

201691225

A1

## **АНТИТЕЛО К PD-1, ЕГО АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ И ИХ МЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Настоящее изобретение относится к антителу к PD-1, фрагменту антитела, связывающему PD-1, химерному антителу и гуманизированным антителам, содержащим CDR указанного антитела к PD-1, а также к фармацевтической композиции, содержащей антитело к PD-1 и антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, а также к их применению в качестве противоракового лекарственного средства.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Противоопухолевая иммунотерапия в течение долгого времени представляет собой «горячую точку» в области терапии опухолей, причем основным ее видом является иммунотерапия рака, связанная с Т-клетками. Противоопухолевая иммунотерапия влияет на опухоли путем полноценного использования и мобилизации цитотоксических Т-лимфоцитов у пациентов с опухолями; такой способ может являться наиболее эффективным и безопасным способом лечения рака. В то же время огромным препятствием, с которым сталкиваются при иммунотерапии опухолей, является уклонение опухоли, при котором раковые клетки посредством их ингибирующего действия на иммунную систему способствуют быстрому росту опухоли.

Существует чрезвычайно сложные отношения между механизмом ускользания опухоли от иммунного ответа и иммунным ответом организма на опухоли. При иммунотерапии опухолей на ранней стадии опухолеспецифические Т-клетки киллеры обладают биологической активностью, но на поздней стадии роста опухоли теряют функцию элиминации. Таким образом, иммунотерапия опухолей главным образом предназначена для усиления ответа собственной иммунной системы пациента на опухоль. Основным в иммунотерапии опухолей является не только активация существующего ответа иммунной системы, но и поддержание продолжительности и интенсивности ответа иммунной системы.

Активация Т-клеток человека в условиях *in vivo* реализуется с помощью системы пути двойного сигналинга, при которой существует необходимость не только в

презентации пептида МНС (главный комплекс гистосовместимости, ГКГ) -антиген Т-клеткам посредством антиген-презентирующих клеток, чтобы обеспечить первый сигнал, но также требуется ряд костимулирующих молекул для обеспечения второго сигнала, после чего Т-клетки проявляют нормальный иммунный ответ. Эта система двойного сигналинга играет жизненно важную роль в балансе иммунной системы и строго регулирует различные иммунные ответы, стимулируемые эндогенными и экзогенными антигенами. Отсутствие второго сигнала, обеспечиваемого костимулирующими молекулами, приведет к отсутствию ответа или к замедленному иммунному ответу специфических Т-клеток, приводящему в результате к толерантности. Таким образом, второй сигнальный путь играет ключевую регуляторную роль во всем процессе иммунного ответа.

Белок программируемой смерти-1 (PD-1), обнаруженный в 1992 г., представляет собой белковый рецептор, экспрессируемый на поверхности Т-клеток и участвующий в апоптозе клеток. Белок PD-1 принадлежит к семейству CD28, обладает 23 % гомологии аминокислотной последовательности с антигеном 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4), но в основном экспрессируется в активированных Т-клетках, В-клетках и миелоидных клетках, в отличие от CTLA. PD-1 имеет два лиганда, PD-L1 и PD-L2, соответственно. PD-L1 в основном экспрессируется в Т-клетках, В-клетках, макрофагах и дендритных клетках (ДК), и его экспрессия повышена в активированных клетках. Экспрессия PD-L2 в основном ограничивается антиген-презентирующими клетками, такими как активированные макрофаги и дендритные клетки.

В новых исследованиях был обнаружен высокий уровень экспрессии белка PD-L1 в тканях опухолей человека, таких как рак молочной железы, рак легкого, рак желудка, рак кишечника, рак почки, меланома и других, и при этом уровни экспрессии PD-L1 тесно связаны с клиническим состоянием и прогнозом у пациентов. Ввиду того, что PD-L1 ингибирует пролиферацию Т-клеток посредством второго сигнального пути, блокирование связывания PD-L1/PD-1 становится особенно перспективной мишенью в области противоопухолевой иммунотерапии.

В настоящее время несколько транснациональных фармацевтических компаний занимаются моноклональными антителами к PD-1, которые максимизируют собственный иммунный ответ пациентов против опухоли, блокируя связывание PD-L1/PD-1, и впоследствии достигают цели элиминации опухолевых клеток, как описано в WO2009114335. Согласно результатам клинических исследований моноклональных

антител к PD-1 компаний BMS и Merck, определенный уровень ответа наблюдали при немелкоклеточном раке легкого, меланоме и раке почки, и при этом указанный уровень ответа демонстрирует заметно высокую релевантность с экспрессией PD-L1 в опухолях, что означает, что антитело к PD-1 оказывает положительное воздействие на опухоли.

В настоящем изобретении предложено антитело к PD-1 с высокой аффинностью, высокой селективностью и высокой биологической активностью.

## **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В настоящем изобретении предложено антитело к PD-1 или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, который содержит:

вариабельную область легкой цепи, содержащую по меньшей мере одну LCDR, выбранную из тех последовательностей, которые представлены в: SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8; и

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере одну HCDR, выбранную из тех последовательностей, которые представлены в: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 6.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором вариабельная область легкой цепи содержит LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 7.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором вариабельная область легкой цепи содержит LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 8.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 3.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено

антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором переменная область тяжелой цепи содержит HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 4.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором переменная область тяжелой цепи содержит HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 5.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, соответственно.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 соответственно.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, соответственно; и при этом переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 соответственно.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, в соответствии с предложенным в настоящем документе антителом к PD-1 или его антигенсвязывающим фрагментом, указанное антитело представляет собой мышиное антитело или его фрагмент.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, в соответствии с предложенным в настоящем документе мышиным антителом или его фрагментом, переменная область легкой цепи дополнительно содержит каркасный участок (FR) легкой цепи мышиной  $\kappa$ -,  $\lambda$ -цепи или его вариант.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мышиное антитело или его фрагмент, предложенный в настоящем документе, дополнительно содержит константную область легкой цепи мышиной  $\kappa$ -,  $\lambda$ -цепи или ее вариант.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, в соответствии с

предложенным в настоящем документе мышинным антителом или его фрагментом, переменная область тяжелой цепи дополнительно содержит FR тяжелой цепи мышинных IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или его вариант.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, мышинное антитело или его фрагмент, предложенный в настоящем документе, дополнительно содержит константную область тяжелой цепи мышинных IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или ее вариант.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, в соответствии с предложенным в настоящем документе антителом к PD-1 или антигенсвязывающим фрагментом, указанное антитело представляет собой химерное антитело или его фрагмент.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, в соответствии с предложенным в настоящем документе химерным антителом к PD-1 или его фрагментом, последовательность переменной области легкой цепи химерного антитела представляет собой SEQ ID NO: 10.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, в соответствии с предложенным в настоящем документе химерным антителом к PD-1 или его фрагментом, последовательность переменной области тяжелой цепи химерного антитела представляет собой SEQ ID NO: 9.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения химерное антитело к PD-1 или его фрагмент, предложенный в настоящем документе, дополнительно содержит константную область легкой цепи человеческой  $\kappa$ -,  $\lambda$ -цепи или ее вариант.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения химерное антитело к PD-1 или его фрагмент, предложенный в настоящем документе, дополнительно содержит константную область тяжелой цепи человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или ее вариант, предпочтительно содержит константную область тяжелой цепи человеческого IgG2 или IgG4, или IgG1, которая не обладает ADCC (антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью) после мутации аминокислоты.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, в соответствии с предложенным в настоящем документе антителом к PD-1 или антигенсвязывающим фрагментом, указанное антитело представляет собой гуманизованное антитело или его

фрагмент.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, в соответствии с предложенным в настоящем документе гуманизированным антителом к PD-1 или его фрагментом, переменная область легкой цепи гуманизованного антитела дополнительно содержит FR легкой цепи человеческой  $\kappa$ -,  $\lambda$ -цепи или его вариант.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, в соответствии с предложенным в настоящем документе гуманизированным антителом к PD-1 или его фрагментом, последовательность FR легкой цепи переменной области легкой цепи гуманизованного антитела получена из комбинации последовательностей легких цепей зародышевой линии человека IGKV1-39 и JK4, представленной в SEQ ID NO: 14, содержащей FR1, FR2 и FR3 IGKV 1-39 и FR4 JK4.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, в соответствии с предложенным в настоящем документе гуманизированным антителом к PD-1 или его фрагментом, последовательность легкой цепи гуманизованного антитела представлена в SEQ ID NO: 12 или ее варианте.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, в соответствии с предложенным в настоящем документе гуманизированным антителом к PD-1 или его фрагментом, вариант переменной области легкой цепи гуманизованного антитела содержит аминокислотную мутацию 0–10 в переменной области легкой цепи, предпочтительно A43S.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения гуманизованное антитело к PD-1 или его фрагмент, предложенный в настоящем документе, дополнительно содержит константную область легкой цепи человеческой  $\kappa$ -,  $\lambda$ -цепи или ее вариант.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, в соответствии с предложенным в настоящем документе гуманизированным антителом к PD-1 или его фрагментом, переменная область тяжелой цепи дополнительно содержит FR тяжелой цепи человеческих IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или его вариант.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, в соответствии с предложенным в настоящем документе гуманизированным антителом к PD-1 или его фрагментом, последовательность FR тяжелой цепи переменной области тяжелой цепи

гуманизированного антитела получена из комбинации последовательностей тяжелых цепей зародышевой линии человека IgHV3-7 и JH6, как представлено в SEQ ID NO: 13, содержащей FR1, FR2 и FR3 IgHV3-7 и FR4 JH6.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, в соответствии с предложенным в настоящем документе гуманизированным антителом к PD-1 или его фрагментом, последовательность тяжелой цепи гуманизированного антитела представлена в SEQ ID NO: 11 или ее варианте; причем вариант предпочтительно содержит аминокислотную мутацию 0–10 в варибельной области тяжелой цепи, более предпочтительно G44R.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения гуманизированное антитело к PD-1 или его фрагмент, предложенный в настоящем документе, дополнительно содержит константную область тяжелой цепи человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или ее вариант, и предпочтительно содержит константную область тяжелой цепи человеческого IgG2 или IgG4, которая не обладает ADCC, или таковую IgG1, которая не обладает ADCC (антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью) после мутации аминокислоты. Предпочтительно, вариант представляет собой мутацию константной области тяжелой цепи, которая вызывает ослабление или недостаточность ADCC, и более предпочтительно N297A, L234A, L235A в IgG1, химере IgG2/4 и F235E или L234A/E235A в IgG4.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, в соответствии с предложенным в настоящем документе антителом к PD-1 или антигенсвязывающим фрагментом, антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, Fv, sFv или F(ab')<sub>2</sub>.

В настоящем изобретении дополнительно предложена молекула ДНК, кодирующая антитело к PD-1 или антигенсвязывающий фрагмент, описанные выше.

В настоящем изобретении дополнительно предложен экспрессионный вектор, содержащий молекулу ДНК, как описано выше.

В настоящем изобретении дополнительно предложена клетка-хозяин, трансформированная экспрессионный вектором, как описано выше.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, в соответствии с предложенной в настоящем документе клеткой-хозяином, указанная клетка-хозяин

представляет собой бактерию, предпочтительно *E. coli*.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложенная в настоящем документе клетка-хозяин представляет собой дрожжи, предпочтительно *Pichia pastoris*.

В настоящем изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель.

В настоящем изобретении дополнительно предложено использование описанного выше антитела к PD-1 или антигенсвязывающего фрагмента, или фармацевтической композиции, которая их содержит, в получении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, опосредованного PD-1; причем указанное заболевание предпочтительно представляет собой рак, более предпочтительно рак, экспрессирующий PD-L1; и указанный рак предпочтительно представляет собой рак молочной железы, рак легкого, рак желудка, рак кишечника, рак почки, меланому и наиболее предпочтительно немелкоклеточный рак легкого, меланому и рак почки.

В настоящем изобретении дополнительно предложен способ лечения и предотвращения заболевания или расстройства, опосредованного PD-1, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, или фармацевтической композиции, которая их содержит; причем указанное заболевание предпочтительно представляет собой рак, более предпочтительно рак, экспрессирующий PD-L1; указанный рак предпочтительно представляет собой рак молочной железы, рак легкого, рак желудка, рак кишечника, рак почки, меланому, немелкоклеточный рак легкого, и наиболее предпочтительно, немелкоклеточный рак легкого, меланому и рак почки.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

Фигура 1. Анализ пролиферации мононуклеарных клеток периферической крови человека. Результаты показывают, что тестируемое антитело к PD-1, mAb005, может эффективно стимулировать пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови человека со значением EC50 83 нг/мл.

Фигура 2. Анализ секреции цитокина ИФН- $\gamma$  мононуклеарными клетками периферической крови человека. Результаты показывают, что тестируемое антитело к PD-1, mAb005, может стимулировать пролиферацию МКПК и в то же время эффективно стимулировать секрецию цитокина ИФН- $\gamma$  со значением EC50 13 нг/мл.

Фигура 3. Ингибирующее влияние антитела к PD-1 H005-1 на рост клеток глиомы.

Фигура 4. Диаграмма, демонстрирующая изменение объема опухоли после лечения.

Фигура 5. Диаграмма, демонстрирующая изменение массы тела мышей после лечения.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

### **1. Определения**

Для упрощения понимания настоящего изобретения некоторые технические и научные термины специально определены ниже. Если в других местах настоящего документа конкретно не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в той области техники, к которой относится настоящее изобретение.

Используемые в настоящем документе однобуквенный код и трехбуквенный код аминокислот описаны в *J. biol. chem*, 243, (1968) p 3558.

Используемый в настоящем документе термин «антитело» относится к иммуноглобулину, структуре в виде четырех пептидных цепей, соединенных вместе дисульфидными связями между двумя идентичными тяжелыми цепями и двумя идентичными легкими цепями. Различные константные области тяжелой цепи иммуноглобулинов демонстрируют разные аминокислотные композиции и упорядоченность, таким образом представляя различные виды антигенности. Соответственно, иммуноглобулины можно разделить на пять категорий, или так называемых изоформ иммуноглобулинов, а именно IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, их тяжелые цепи представляют собой  $\mu$ -цепь,  $\delta$ -цепь,  $\gamma$ -цепь,  $\alpha$ -цепь и  $\epsilon$ -цепь, соответственно. В соответствии с аминокислотной композицией шарнирной области и числом и расположением дисульфидных связей в тяжелой цепи один и тот же тип Ig можно разделить на различные подкатегории, например, IgG можно разделить на IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. На основании различных константных областей легкую цепь можно

разделить на  $\kappa$ - или  $\lambda$ -цепь. Каждый из пяти Ig может иметь  $\kappa$ - или  $\lambda$ -цепь.

В настоящем изобретении переменная область легкой цепи антитела, упомянутая в настоящем документе, дополнительно содержит константную область легкой цепи, которая содержит  $\kappa$ -,  $\lambda$ -цепь человека или мыши, или их вариант.

В настоящем изобретении переменная область тяжелой цепи антитела, упомянутая в настоящем документе, дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, которая содержит IgG1, 2, 3, 4 человека или мыши, или их вариант.

Последовательность тяжелых цепей и легких цепей антитела возле N-конца, состоящая из около 110 аминокислот, которая обладает значительной переменностью, известна как переменная область (V-область); оставшаяся часть аминокислотной последовательности возле C-конца является относительно стабильной и известна как константная область (C-область). Переменная область содержит три гиперпеременных участка (HVR) и четыре относительно консервативных последовательности каркасного участка (FR). Эти три гиперпеременных участка определяют специфичность антитела, и также известны как область, определяющая комплементарность (CDR). Каждая переменная область легкой цепи (LCVR) и каждая переменная область тяжелой цепи (HCVR) состоит из трех CDR и четырех FR, со следующим последовательным порядком от аминоконца к карбоксиконцу: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Три CDR легкой цепи называют LCDR1, LCDR2 и LCDR3; три CDR тяжелой цепи называют HCDR1, HCDR2 и HCDR3. Количество и расположение аминокислотных остатков CDR в LCVR и HCVR антитела или антигенсвязывающего фрагмента в настоящем документе соответствуют известным критериям нумерации по Kabat (LCDR1-3, HCDE2-3) или соответствуют критериям нумерации по Kabat и Chothia (HCDR1).

Термин «мышинное антитело» в настоящем изобретении относится к моноклональному антителу к PD-1 человека, полученному в соответствии со знаниями и практическим опытом в данной области техники. Во время получения исследуемому объекту инъецировали антиген PD-1, а затем выделяли гибридому, экспрессирующую антитело, обладающее требуемой последовательностью или функциональными характеристиками. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мышинное антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область легкой цепи мышинной  $\kappa$ -,  $\lambda$ - цепи или ее вариант, или дополнительно содержит константную область тяжелой цепи мышинного IgG1, IgG2, IgG3

или IgG4, или ее вариант.

Термин «химерное антитело» представляет собой антитело, которое образовано путем слияния вариабельной области мышиного антитела с константной областью человеческого антитела, причем указанное химерное антитело может облегчать иммунный ответ, индуцированный мышинным антителом. Для создания химерного антитела вначале создают гибридому, секретирующую специфическое мышинное моноклональное антитело, из клеток мышинной гибридомы клонируют ген вариабельной области, затем по необходимости клонируют ген константной области человеческого антитела, мышинный ген вариабельной области лигируют с человеческим геном константной области с образованием химерного гена, который можно вставить в человеческий вектор, и, наконец, молекулу химерного антитела экспрессируют в эукариотической или прокариотической промышленной системе. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, вариабельная область легкой цепи химерного антитела к PD-1 дополнительно содержит FR легкой цепи мышинной  $\kappa$ -,  $\lambda$ -цепи или его вариант, а последовательность вариабельной области легкой цепи показана в SEQ ID NO: 10. Вариабельная область тяжелой цепи химерного антитела к PD-1 дополнительно содержит FR тяжелой цепи мышинных IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или его вариант, а последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 10. Константную область человеческого антитела выбирают из константной области тяжелой цепи человеческих IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или ее варианта, предпочтительно она содержит константную область тяжелой цепи человеческого IgG2 или IgG4, или таковую IgG1, которая не обладает ADCC (антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью) после мутации аминокислоты.

Термин «гуманизированное антитело», также известный как «CDR-привитое антитело», относится к антителу, создаваемому посредством встраивания (прививания) мышинных последовательностей CDR в каркас вариабельной области человеческого антитела, а именно, в последовательность другого типа каркаса человеческого антитела зародышевой линии. Гуманизированное антитело преодолевает недостатки сильного иммунного ответа, индуцированного химерным антителом, которое несет в себе большое количество мышинных белковых компонентов. Такие каркасные последовательности могут быть получены из общедоступной базы данных ДНК, включающей в себя последовательности генов антител зародышевой линии или из опубликованных источников. Например, последовательности ДНК зародышевой линии человеческих генов вариабельной области тяжелой и легкой цепи можно найти в базе

данных последовательностей зародышевой линии человека VBase (доступна на веб-сайте [www.mrccpe.com.ac.uk/vbase](http://www.mrccpe.com.ac.uk/vbase)), а также можно найти в публикации Kabat, EA, et al, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> Ed. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мышинные последовательности CDR гуманизированного антитела к PD-1 выбирают из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8. Каркасы вариабельной области человеческого антитела были разработаны и выбраны таким образом, чтобы последовательность FR легкой цепи вариабельной области легкой цепи антитела была получена из комбинации последовательностей легких цепей зародышевой линии человека IGKV1-39 и JK4: SEQ ID NO: 14, содержащей FR1, FR2 и FR3 IGKV 1-39 и FR4 JK4; последовательность FR тяжелой цепи вариабельной области тяжелой цепи антитела получена из комбинации последовательностей тяжелых цепей зародышевой линии человека IgHV3-7 и JH6: SEQ ID NO: 13, содержащей FR1, FR2 и FR3 IgHV3-7 и FR4 JH6. Для того, чтобы избежать снижения активности во время уменьшения иммуногенности, вариабельную область человеческого антитела подвергают минимальной обратной мутации для поддержания активности.

Используемый в настоящем документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту Fab, фрагменту Fab', фрагменту F(ab')<sub>2</sub> с антигенсвязывающей активностью, а также к фрагменту Fv, фрагменту sFv, связывающемуся с человеческим PD-1; содержащему одну или более областей CDR антител, описанных в настоящем изобретении, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 до SEQ ID NO: 8. Fv-фрагмент представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит вариабельную область тяжелой цепи, вариабельную область легкой цепи и все антигенсвязывающие сайты без константной области. Обычно антитело Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL и способно образовывать структуру, необходимую для связывания антигена. Кроме того, различные линкеры могут быть использованы для соединения вариабельных областей двух антител с образованием полипептида, называемого одноцепочечным антителом или одноцепочечным Fv (sFv). Используемый в настоящем документе термин «связывание с PD-1» означает взаимодействие с человеческим PD-1. Используемый в настоящем документе термин «антигенная детерминанта» по настоящему изобретению относится к не располагающимся непрерывно трехмерным сайтам на антигене, распознаваемым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению.

Используемый в настоящем документе термин «ADCC», то есть «антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность», относится к клеткам, экспрессирующими

Fc-рецепторы, непосредственно элиминирующим клетки-мишени, покрытые антителом, посредством распознавания Fc-сегмента антитела. ADCC-эффекторная функция антитела может быть уменьшена или устранена посредством модификации сегмента Fc в IgG. Модификация относится к мутациям константной области тяжелой цепи антитела, таким как мутации, выбранные из N297A, L234A, L235A в IgG1; химеры IgG2/4; F235E или мутаций L234A/E235A в IgG4.

Используемый в настоящем документе термин «гибридный белок», описанный в настоящем изобретении, представляет собой белковый продукт, полученный посредством коэкспрессии двух генов с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Рекомбинантный гибридный белок, состоящий из внеклеточного домена PD-1 и Fc, получен посредством коэкспрессии внеклеточного домена PD-1 и фрагмента Fc антитела человека с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Внеклеточный домен PD-1 относится к фрагменту PD-1 за пределами мембраны клетки, последовательность которого представляет собой отмеченную область SEQ ID NO: 1, представленной ниже.

Способы получения и очистки антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые хорошо известны в данной области, можно найти, например, в книге *Antibody Experimental Technology Guide of Cold Spring Harbor*, глава 5–8 и 15. Например, мыши могут быть иммунизированы человеческим PD-1 или его фрагментами, а полученные антитела могут быть ренатурированы, очищены и секвенированы с использованием обычных способов, хорошо известных в данной области техники. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть также получены обычными способами. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению генетически модифицируют, чтобы ввести один или более человеческих каркасных участков (FR) в CDR, полученную не от человека. Последовательности FR зародышевой линии человека можно получить из базы данных *ImMunoGeneTics (IMGT)* через их вебсайт <http://imgt.cines.fr>, или из книги *The Immunoglobulin FactsBook*, 2001 ISBN 012441351. В частности, FR легкой цепи зародышевой линии для использования в антителе или антигенсвязывающем фрагменте по настоящему изобретению включает A3 и O2. В частности, FR тяжелой цепи зародышевой линии для использования в антителе или антигенсвязывающем фрагменте по настоящему изобретению включает VH3-21 и VH3-23.

Сконструированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут быть получены и очищены с использованием обычных способов. Например, последовательности кДНК, кодирующие тяжелую цепь (SEQ ID NO: 11) и

легкую цепь (SEQ ID NO: 12), можно клонировать и рекомбинировать в экспрессионный вектор GS. Экспрессионным вектором рекомбинантного иммуноглобулина можно затем стабильно трансфицировать клетки CHO. Как более рекомендуемый способ, хорошо известный в данной области техники, экспрессия антител в клетках млекопитающих приводит к гликозилированию, как правило, в высококонсервативном N-конце области FC. Стабильные клоны могут быть получены путем экспрессии антитела, специфически связывающегося с человеческим PCSK9. Положительные клоны можно выращивать в культуральной среде, не содержащей сыворотки, для продуцирования антител в биореакторах. Культуральную среду, в которой было секретировано антитело, можно очищать посредством обычных методик. Например, среду можно легко вводить в колонку Sepharose FF, заполненную белком A или белком G, уравновешенную совместимым буфером. Колонку промывают для удаления компонентов неспецифического связывания. Связанное антитело элюируют градиентом pH, и фрагменты антител обнаруживают с помощью ДСН-ПААГ, а затем объединяют. Антитело можно фильтровать и концентрировать с использованием обычных методик. Растворимый агрегат и мультимеры можно эффективно удалять с использованием обычных методик, включая гель-фильтрацию или ионный обмен. Полученный продукт может быть немедленно заморожен, например, при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , или он может быть лиофилизирован.

Антитело по настоящему изобретению представляет собой моноклональное антитело. Моноклональное антитело или mAb, при использовании в настоящем документе, относится к антителу, полученному из одного клона, включая, без ограничения, любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон. Моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты можно рекомбинировать, например, с помощью методик гибридомы, методик рекомбинации, методик фагового дисплея, синтетических методик (например, CDR-прививка) или других методик, известных в данной области техники.

Термины «введение» и «обработка» по отношению к животному, человеку, субъекту исследования, клетке, ткани, органу или биологической жидкости относятся к приведению в контакт экзогенного фармацевтического, терапевтического, диагностического средства или композиции с животным, человеком, субъектом, клеткой, тканью, органом или биологической жидкостью. Термины «введение» и «обработка» могут относиться, например, к терапевтическим, фармакокинетическим, диагностическим, исследовательским и экспериментальным способам. Обработка клетки включает контактирование реагента с клеткой, а также контактирование реагента с жидкостью, причем жидкость находится в контакте с клеткой. Термины «введение» и «обработка»

также означают обработку *in vitro* и *ex vivo*, например, клетки, с помощью реагента, диагностического, связывающего соединения или другой клеткой. «Лечение» в отношении человека, субъекта ветеринарии или исследования относится к терапевтическому лечению, профилактическим или превентивным мерам, к применению в исследовании и диагностики.

«Лечить» означает вводить терапевтическое средство, такое как композиция, содержащая любое из связывающих соединений по настоящему изобретению, внутренне или внешне пациенту, имеющему один или более симптомов заболевания, в отношении которого средство обладает известной терапевтической активностью. Как правило, средство вводят в количестве, эффективном для облегчения одного или более симптомов заболевания у пациента или популяции, подлежащей лечению, либо посредством индуцирования регрессии или ингибирования прогрессирования такого (-их) симптома (-ов) до какой-либо клинически измеримой степени. Количество терапевтического средства, которое является эффективным для облегчения какого-либо конкретного симптома заболевания (также называемое «терапевтически эффективным количеством»), может изменяться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст и масса тела пациента, а также способности препарата вызывать желаемый ответ у пациента. Происходит ли облегчение симптома заболевания, можно оценить посредством любого клинического измерения, которое обычно используется врачами или другими квалифицированными поставщиками медицинских услуг для оценки степени тяжести или прогрессирования данного симптома. Хотя вариант осуществления настоящего изобретения (например, способ лечения или изделие) может не быть эффективным для облегчения симптома (-ов) заболевания, представляющего (-их) интерес, у каждого пациента, он должен облегчать симптом (-ы) целевой болезни, представляющей интерес, у статистически значимого количества пациентов, как определено любым статистическим тестом, известным в данной области техники, таким как критерий Стьюдента, критерий хи-квадрат, U-критерий Манна и Уитни, критерий Краскела-Уоллиса (H-критерий), критерий Джонкхиера-Терпстра и критерий Вилкоксона.

«Консервативные модификации» или «консервативное замещение или замена» относится к заменам аминокислот в белке на другие аминокислоты с аналогичными характеристиками (например, заряд, размер боковой цепи, гидрофобность/гидрофильность, конформация остова и жесткость и т. д.) так, что изменения часто могут быть произведены без влияния на биологическую активность белка. Специалистам в данной области техники будет понятно, что, в основном,

одиночные аминокислотные замены в несущественных областях полипептида по сути не изменяют биологическую активность (см., например, Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4<sup>th</sup> Ed.)). Кроме того, замещения структурно или функционально сходными аминокислотами с меньшей вероятностью нарушают биологическую активность.

Термин «состоящий по существу из» или его вариация при использовании в описании и пунктах формулы изобретения указывает на включение любых перечисленных элементов или группы элементов, и необязательное включение других элементов сходной или другой природы, чем перечисленные элементы, которые не изменяют фактически основных или новых свойств указанного режима дозирования, способа или композиции. В качестве неограничивающего примера, связывающее соединение, которое по существу состоит из упомянутой аминокислотной последовательности, может также включать в себя одну или более аминокислот, которые фактически не оказывают влияния на свойства связывающего соединения.

«Эффективное количество» включает в себя количество, достаточное для ослабления или предотвращения симптома или признака медицинского состояния. Эффективное количество также означает количество, достаточное для обеспечения или облегчения постановки диагноза. Эффективное количество для конкретного пациента или субъекта ветеринарии может изменяться в зависимости от таких факторов, как состояние, подвергаемое лечению, общее состояние здоровья пациента, способ и доза введения и тяжесть побочных эффектов. Эффективное количество может представлять собой максимальную дозу или протокол дозирования, что позволяет избежать значительных побочных эффектов или токсических эффектов.

Термин «экзогенные» относится к веществам, которые, в зависимости от контекста, производятся вне организма, клетки или тела человека. Термин «эндогенные» относится к веществам, которые, в зависимости от контекста, производятся внутри клетки, организма или тела человека.

Термин «гомология» относится к сходству последовательностей между двумя полинуклеотидными последовательностями или между двумя полипептидами. Когда положение в обеих из двух сравниваемых последовательностей занято одной и той же мономерной субъединицей основания или аминокислоты, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, в таком случае молекулы являются

гомологичными по данному положению. Процент гомологии между двумя последовательностями представляет собой функцию от числа совпадающих или гомологичных положений, общих для указанных двух сравниваемых последовательностей, деленных на число сравниваемых положений  $\times 100$ . Например, если при оптимальном выравнивании последовательностей 6 из 10 положений в двух последовательностях совпадают или являются гомологичными, тогда указанные последовательности являются на 60 % гомологичными. Обычно сравнение проводят в тех случаях, когда две последовательности при выравнивании имеют максимальный процент гомологии.

Используемые в настоящем описании выражения «клетка», «клеточная линия» и «клеточная культура» используют взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают потомство. Таким образом, слова «трансформанты» и «трансформированные клетки» включают первичную клетку субъекта и полученные из нее культуры без учета числа переносов. Также следует понимать, что все потомство может быть не точно идентично по содержащейся ДНК вследствие преднамеренных или случайных мутаций. Также включено мутантное потомство, которое имеет такую же функцию или биологическую активность, по которой проводили скрининг исходно трансформированной клетки. Из контекста будет понятно, в каком случае нужны четкие обозначения.

При использовании в настоящем документе, «полимеразная цепная реакция» или «ПЦР» относится к процедуре или способу, в котором малые количества специфического фрагмента нуклеиновой кислоты, РНК и/или ДНК амплифицируют, как описано, например, в патенте США № 4683195. В целом, информация о последовательностях концов области, представляющей интерес, или за ее пределами должна быть доступна, чтобы можно было сконструировать олигонуклеотидные праймеры; эти праймеры должны быть идентичны или схожи по последовательности с соответствующими цепями матрицы, подлежащей амплификации. 5' концевые нуклеотиды двух праймеров могут быть идентичными с концами амплифицируемого вещества. ПЦР можно использовать для амплификации специфических последовательностей РНК, специфических последовательностей ДНК из полной геномной ДНК и кДНК, транскрибированной с общей клеточной РНК, последовательности бактериофага или плазмиды и т. д. В целом, см. Mullis et al. (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich, ed., (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.). При использовании в настоящем документе, ПЦР рассматривают в качестве одного, но не единственного примера способа полимеразной реакции нуклеиновой кислоты для амплификации тестируемого образца нуклеиновой кислоты, включающего применение известной нуклеиновой кислоты в качестве праймера

и полимеразы нуклеиновой кислоты для амплификации или создания специфического фрагмента нуклеиновой кислоты.

Термины «необязательный» или «необязательно» означает, что следующее событие или ситуация может произойти, но не безусловно произойдет, и описание включает в себя случаи, в которых событие или обстоятельство происходит или не происходит. Например, «необязательно содержит 1–3 переменные области тяжелой цепи антитела» означает, что переменная область тяжелой цепи антитела со специфической последовательностью может присутствовать, но присутствует не обязательно.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции, содержащей смесь одного или более соединений по настоящему изобретению или их физиологически/фармацевтически приемлемую соль или пролекарство с другими химическими компонентами, а также дополнительные компоненты, такие как физиологически/фармацевтически приемлемые носители и наполнители. Фармацевтическая композиция направлена на содействие введению в организм, облегчению абсорбции активного ингредиента и, таким образом, проявление биологического эффекта.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Далее настоящее изобретение описано со ссылкой на примеры; тем не менее, объем настоящего изобретения не ограничивается ими. В примерах настоящего изобретения, в которых конкретные условия не описаны, эксперименты, как правило, проводят в обычных условиях, как описано в работе *Antibody Technology Laboratory Manual and Molecular Cloning Manual of Cold Spring Harbor* или в условиях, предложенных производителями материалов или изделий. Если источник реагентов конкретно не указан, реагенты являются коммерчески доступными распространенными реагентами.

### **Пример 1. Получение антитела**

Были созданы мышинные моноклональные антитела к PD-1 человека. Очищенный рекомбинантный гибридный белок, состоящий из внеклеточного домена PD-1 и Fc (PD-1 Fc) (SEQ ID NO: 1); или клетки CHO, трансфицированные PD-1 (SEQ ID NO: 2) использовали в качестве антигена для иммунизации мышей линии Balb/C и мышей линии SJL. Человеческий антиген PD-1 приобретали в компании ORIGENE, номер по каталогу SC117011, эталонная последовательность NCBI: NM\_005018.1.

PD-1 Fc, рекомбинантный гибридный белок, состоящий из внеклеточного домена PD-1 и Fc (SEQ ID NO: 1):

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGRCPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATF  
TCSEFNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDF  
HMSVVRARRNDSGTYLCAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPR  
 PAGQFQTLVDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV  
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
 YKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF  
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS  
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK .

PD-1, антиген PD-1 для трансфекции клеток (SEQ ID NO: 2):

MQIPQAPWPVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFT  
 CSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFH  
 MSVVRARRNDSGTYLCAISLAPKAQIKESI.RAELRVTERRAEVPTAHPSPSPR  
 AGQFQTLVVGVVGGI.LGSI.VLLVWVLAVICSRRAARGTIGARRTGQPI.KEDPSAV  
 PVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGP  
 RSAQPLRPEDGHCSWPL .

Иммунизация гибридным белком, состоящим из внеклеточного домена PD-1 и Fc, делится на высокую дозу (50 мкг) и низкую дозу (10 мкг) очищенного антигена, для иммунизации клетками CHO, трансфицированными PD-1, используют  $0,5-1 \times 10^7$  клеток. Иммунизацию проводили с полным адъювантом Фрейнда на 0, 14 и 35-й день, соответственно; для мониторинга иммунного ответа образцы крови отбирали в ретро-орбитальной области. Мышей с титром иммуноглобулина человека к PD-1 получали путем скрининга плазмы с использованием анализа ИФА. На 56-й день мышей с самым высоким титром иммуноглобулина человека к PD-1 подвергали бустер-иммунизации. Через 3 дня мышей умерщвляли и удаляли селезенку для выполнения слияния. Проводили скрининг слияний гибридом и получали мышинное моноклональное антитело mAb005. Последовательность вариабельной области тяжелой цепи и последовательность вариабельной области легкой цепи мышинного моноклонального антитела mAb005 являются следующими:

mAb005 HCVR  
 EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYMMMSWVRQTPEKRLEWVATISG  
 GGANTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLSRSEDALYYCARQLYYFDYW  
 GQGTTLVSS SEQID NO: 9

mAb005 LCVR  
 DIQMTQSPASQSASLGEGVTITCLASQTIGTWLWYQQKPGKSPQLLIYTATSLA  
 DGVPSRFSGSGSGTKFSEKISSLQAEDFVITYCQQVYSIPWTFGGGKLEIK  
 SEQID NO: 10

Последовательности CDR являются следующими:

Название	Последовательность	Нумерация
HCDR1	SYMMMS	SEQID NO: 3
HCDR2	TISGGGANTYYPDSVKG	SEQID NO: 4
HCDR3	QLYYFDY	SEQID NO: 5
LCDR1	LASQTIGTWLT	SEQID NO: 6
LCDR2	TATSLAD	SEQID NO: 7
LCDR3	QQVYSIPWT	SEQID NO: 8

### Пример 2: Скрининг антител

Анализ ИФА связывания антитела к PD-1 *in vitro*:

Антитело к PD-1 блокирует путь сигналинга PD-1 и его лиганда посредством связывания с внеклеточным доменом PD-1. Анализ ИФА *in vitro* используют для определения свойства связывания антитела к PD-1. Лунки 96-луночных планшетов покрывали биотинилированным гибридным белком, состоящим из внеклеточного домена PD-1 и Fc (PD-1 Fc), посредством связывания с нейтрализующим авидином. Интенсивность сигнала после добавления антитела использовали для определения свойства связывания антитела и PD-1.

Нейтрализующий авидин (связывающийся с биотином) разбавляли буфером PBS до 1 мкл/мл, добавляя пипеткой в 96-луночный планшет в количестве 100 мкл/лунку, и оставляли на 16 - 20 часов при температуре 4 °C. После удаления буфера PBS 96-луночный планшет промывали один раз PBST (pH 7,4, PBS, содержащий 0,05 % твин 20), после чего планшет инкубировали и блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре добавлением 120 мкл/лунку PBST/1 % молоко. После удаления блокирующего раствора планшет промывали буфером PBST с последующим добавлением

1 мкг/мл меченного биотином антитела PD1-FC, которое разводили в PBST/1 % молоко, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После удаления блокирующего раствора планшет 3 раза промывали буфером PBST с последующим добавлением исследуемого антитела к PD-1, которое разводили до подходящей концентрации в PBST/1 % молоко, и инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. После удаления реакционной системы планшет 3 раза промывали буфером PBST с последующим добавлением 100 мкл/лунку меченного HRP вторичного антимишиного антитела (The Jackson Laboratory), которое разводили в PBST/1 % молоко, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После трехкратного промывания PBST в планшет добавляли 100 мкл/лунку ТМВ и инкубировали в течение 5–10 мин при комнатной температуре. Затем реакцию прекращали добавлением 100 мкл/лунку 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Значение оптической плотности при 450 нм считывали на планшет-ридере NOVOSTar; рассчитывали значение связывания EC<sub>50</sub> в ИФА.

Исследуемое антитело	ИФА, EC <sub>50</sub> , нМ	
	PD-1 человека	PD-1 яванского макака
mAb005	0,25	0,27

Результаты показали, что антитело mAb005 обладает превосходной активностью связывания с PD-1Fc человека (PD-1 человека) и PD-1Fc яванского макака (PD-1 яванского макака).

Анализ блокирования связывания антитела к PD-1 и лиганда PD-1 *in vitro*:

На поверхности опухолевых клеток PD-L1 демонстрирует супрессорное действие на пролиферацию Т-клеток посредством связывания с PD-1 на поверхности Т-клетки. Антитело к PD-1 блокирует путь сигналинга PD-L1/PD-1 посредством связывания с PD-1 так, что происходит стимуляция пролиферации Т-клеток. Анализ блокирования связывания PD-1/PD-L1 используют для обнаружения блокирующей активности антитела к PD-1 на путь сигналинга.

В данном эксперименте 96-луночный планшет покрывали белком PD-1 с внеклеточным доменом, слитым с FC (PD-1-FC) и инкубировали с исследуемым антителом к PD-1; позже к инкубации добавляли меченный биотином PD-L1. После

промывания планшета определяли количество связанного PD-L1, меченного биотином; рассчитывали значение IC<sub>50</sub> блокирования связывания антитела PD-1 и лиганда PD-L1.

PD-1-FC разбавляли до 1 мкг/мл буфером СВ с pH 9,6 (1,59 г Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и 2,93 г NaHCO<sub>3</sub> растворяли в 1 л дистиллированной воды), добавляли пипеткой в 96-луночный планшет в количестве 100 мкл/лунка и оставляли на 16 - 20 часов при температуре 4 °С. После удаления буфера PBS 96-луночный планшет промывали один раз PBST (pH 7,4, PBS, содержащий 0,05 % твин 20), после чего планшет инкубировали и блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре с использованием 120 мкл/лунку PBST/1 % молоко. После удаления блокирующего раствора планшет промывали один раз буфером PBST с последующим добавлением 90 мкл исследуемого антитела к PD-1, которое разводили до подходящей концентрации разбавителями образцов (pH 7,4 PBS, содержащий 5 % БСА, 0,05 % твин 20), и инкубировали в течение 1 ч при 4 °С. Затем в планшет добавляли 10-кратные концентрации меченного биотином PD-L1 (Beijing Sino Biological Inc.) (10 мкг/мл) в количестве 10 мкл/лунку, подвергали воздействию вибрации и смешивали с помощью вибрирующей мешалки, и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. После удаления реакционной системы планшет 6 раз промывали буфером PBST с последующим добавлением 100 мкл/лунку полимера стрептавидина-пероксидазы который разводили PBST в соотношении 1:400, и инкубировали при воздействии вибрации 50 мин при комнатной температуре. После промывания PBS 6 раз в планшет добавляли 100 мкл/лунку ТМВ и инкубировали в течение 5–10 мин при комнатной температуре. Затем реакцию прекращали добавлением 100 мкл/лунку 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Значение оптической плотности при 450 нм считывали на планшет-ридере NOVOSTar; рассчитывали значение IC<sub>50</sub> блокирования связывания PD-1 и лиганда PD-L1.

Исследуемое	Анализ LBB
антитело	IC <sub>50</sub> , нМ
mAb005	1,13

Результаты показали, что антитело mAb005 очень эффективно блокирует связывание PD-L1 с PD-1.

### **Пример 3: Анализ селективности связывания антитела к PD-1 in vitro**

Для обнаружения специфической активности связывания антитела к PD-1 с другими

белками семейства PD-1, для анализов связывания использовали CTLA4 человека и CD28 человека. В то же время для анализов связывания также использовали PD-1 мышей, чтобы определить многообразие форм антитела к PD-1 для видов, отличных от человека/обезьяны.

Селективно-связывающие белки: PD-1 человека, ICOS человека, CTLA4 человека, CD28 человека и PD-1 мыши (Beijing Sino Biological Inc.), соответственно, разводили до концентрации 1 мкг/мл буфером PBS, добавляли пипеткой в 96-луночный планшет в количестве 100 мкл/лунка и оставляли на 16 - 20 часов при температуре 4 °С. После удаления буфера PBS 96-луночный планшет промывали один раз PBST (рН 7,4, PBS, содержащий 0,05 % твин 20), после чего планшет инкубировали и блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре с использованием 120 мкл/лунку PBST/1 % молоко. После удаления блокирующего раствора планшет 3 раза промывали буфером PBST с последующим добавлением исследуемого антитела к PD-1, и инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. После удаления реакционной системы планшет 3 раза промывали PBST с последующим добавлением 100 мкл/лунку меченного HRP вторичного антитела против антитела мыши (The Jackson Laboratory), которое разводили в PBST/1 % молоке, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет 3 раза промывали PBST с последующим добавлением 100 мкл/лунку TMB и инкубировали в течение 5–10 мин при комнатной температуре. Затем реакцию прекращали добавлением 100 мкл/лунку 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Значение оптической плотности при 450 нм считывают на планшет-ридере NOVOSTar.

Исследуемое антитело	PD1-FC человека	PD1-Fc мыши	ICOS/Fc человека	CTLA4 человека	CD28 человека
mAb005	2,64	0,07	0,15	0,17	0,12

Результаты показали, что антитело mAb005 не демонстрирует специфической активности связывания с другими белками семейства PD-1. В то же время mAb не имеет видовой перекрестной реактивности против мышинового PD-1.

#### **Пример 4: Клеточный анализ связывания антитела к PD-1 *in vitro***

FACS (клеточный сортировщик с активацией флуоресценции) представляет собой способ исследования для обнаружения взаимодействия белков и клеток. Анализ используют для обнаружения активности связывания антитела к PD-1 с нативным PD-1, экспрессируемым на поверхности клетки. Клетки, используемые в анализе, представляли

собой клетки CHO с высоким уровнем экспрессии PD-1 (см. Пример 1, клетки CHO, трансфицированные PD-1 (SEQ ID NO: 2)).

Клетки CHO с высоким уровнем экспрессии PD-1 центрифугировали со скоростью 1000 об/мин в течение 5 минут, и осадок собирали и суспендировали с 10-15 мл предварительно охлажденного проточного буфера для подсчета клеток. Клетки центрифугировали со скоростью 1000 об/мин в центрифужных пробирках объемом 50 мл в течение 5 минут и собирали. После удаления надосадочной жидкости осадок повторно суспендировали с предварительно охлажденным блокирующим буфером, с плотностью  $0,5-1,0 \times 10^7$  клеток/мл. После инкубации при 4 °C в течение 30 минут, повторную суспензию добавляли пипеткой в 96-луночный планшет в количестве 100 мкл/лунку. 96-луночный планшет центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 минут, супернатант утилизировали. В каждую лунку добавляли 100 мкл первичного антитела; клетки ресуспендировали и инкубировали в темноте в течение 60 минут при 4 °C. После центрифугирования и утилизации супернатанта добавляли 100 мкл FITC-меченного вторичного антитела (BD Biosciences), разведенного в соотношении 1:400. Клетки ресуспендировали и инкубировали в темноте в течение 60 минут при 4 °C. Клетки дважды промывали проточным буфером, ресуспендировали и фиксировали 1 % параформальдегидом для анализа проточной цитометрии.

Исследуемое антитело	СИФ (средняя интенсивность флуоресценции)			
	50 нМ	5 нМ	0,5 нМ	0,05 нМ
mAb005	468	319	71,2	14

Результаты показывают, что антитело mAb005 также может связываться с PD-1 на клеточной поверхности.

#### **Пример 5: Анализ аффинности и кинетики связывания *in vitro***

Способ Viacore является признанным анализом, который объективно определяет аффинность и кинетику взаимодействия белков. Авторы изобретения проанализировали охарактеризованные аффинность и кинетику связывания исследуемого антитела к PD-1 по настоящему изобретению с помощью анализа Viacore (GE).

В соответствии с инструкцией к набору, предоставленной Biacore, исследуемое антитело к PD-1 по настоящему изобретению было ковалентно связано с чипом CM5 (GE) с использованием стандартного способа аминного связывания. Затем в каждый цикл последовательно загружали ряд градиентных концентраций белка PD-1-His (Beijing Sino Biological Inc.), который разводили в том же буфере. После этого образцы восстанавливали с помощью восстанавливающего реагента из набора. Кинетику связывания антиген-антитело отслеживали в течение 3 минут, а кинетику диссоциации отслеживали в течение 10 минут. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения BIAevaluation от GE с использованием модели связывания 1:1 (Ленгмюра). Значения  $K_a$  (kon),  $k_d$  (koff) и  $K_D$ , определенные с помощью анализа, представлены в таблице ниже.

Исследуемое антитело	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (М)
mAb005	1,057E+5	3,769E-4	3,566E-9

Результаты показали, что значение  $K_d$  связывания антитела mAb005 с PD-1 достигло 3,57 нМ.

### Пример 6. Цитологический анализ *in vitro*

Анализ пролиферации свежих мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК) при воздействии антитела использовали для обнаружения активности антитела mAb005 в отношении клеток.

Плотность свежих МКПК доводили до  $2 \times 10^6$ /мл, высевали в 6-луночный планшет в количестве 2 мл/лунку и инкубировали в течение 6 часов при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>. После утилизации взвешенных клеток каждую лунку с адгезивными клетками смешивали с 2 мл среды RPMI1640, содержащей 100 нг/мл GM-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий биологический фактор) и 100 нг/мл ИЛ-4, и после инкубации в течение 2 дней добавляли еще 1 мл среды RPMI1640, содержащей 100 нг/мл GM-CSF и 100 нг/мл ИЛ-4, затем клетки непрерывно культивировали в течение 2 дней с последующим добавлением в каждую лунку 100 нг/мл ФНО- $\alpha$  (фактор некроза опухоли- $\alpha$ ), и культивировали в течение еще 2 дней, чтобы получить зрелые дендритные клетки. Дендритные клетки и аллогенные Т-клетки, соответственно, центрифугировали и ресуспендировали в концентрации  $1 \times 10^6$ /мл и  $1 \times 10^5$ /мл, добавляли пипеткой в 96-луночный планшет в количестве 100 мкл/лунка с последующим добавлением 20

мкл/лунка антител, которые разводили PBS до различных градиентов концентрации, и клетки культивировали в термостате при температуре 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub> в течение 5 дней. После этого отбирали 100 мкл клеточной культуры, чтобы обнаружить пролиферацию клеток с помощью люминесцентного набора для определения жизнеспособности клеток CellTiter-Glo®. Результаты, показанные на Фигуре 1, указывают, что тестируемое антитело к PD-1, mAb005, может эффективно стимулировать пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови человека со значением EC50 83 нг/мл. В оставшемся образце проводили обнаружение секреции цитокина ИФН-γ. Результаты, показанные на Фигуре 2, демонстрируют, что тестируемое антитело к PD-1, mAb005, может стимулировать пролиферацию МКПК и в то же время эффективно стимулировать секрецию цитокина ИФН-γ со значением EC50 13 нг/мл.

### Пример 7: Гуманизация мышинового антитела

С учетом последовательности вариабельной области легкой цепи (mAb005 LCVR, SEQ ID NO: 10) и вариабельной области тяжелой цепи (mAb005 HCVR, SEQ ID NO: 9) антитела mAb005, в базе данных зародышевой линии были выбраны гуманизированные матрицы, наилучшим образом соответствующие их областям, не являющимся CDR. Матрица тяжелой цепи антитела представляет собой IgHV3-7/JH6, выбранную для FR1, FR2, FR3 легкой цепи зародышевой линии человека IGKV1-39 и FR4 JK4 с последовательностью SEQ ID NO: 13; матрица тяжелой цепи антитела представляет собой IGKV1-39/JK4, выбранную для FR1, FR2, FR3 легкой цепи зародышевой линии человека IGKV1-39 и FR4 JK4 с последовательностью SEQ ID NO: 14.

Матрица тяжелой цепи зародышевой линии человека (SEQ ID NO: 13):

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQ
DGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSI.YLQMNSLRAEDTAVYYCARWGQGTTV
TVSS;
```

Матрица легкой цепи зародышевой линии человека (SEQ ID NO: 14):

```
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTLSLQPEDFATYYCFGGGTKVEIK .
```

CDR мышинового антитела прививали к выбранной матрице гуманизации, замещая CDR матрицы человека, после чего выполняли рекомбинацию с константной областью IgG4 с получением гуманизированного антитела H005-1. Затем на основе трехмерной

структуры мышинового антитела, внедренные остатки, остатки непосредственно взаимодействующие с CDR и остатки, которые существенно влияют на конформацию VL и VH, подвергали обратной мутации для получения следующих последовательностей гуманизованных антител H005-2, H005-3 и H005-4.

### Экспрессия антител

#### H005-1 HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMMSWVRQAPGKGLEWVATISG  
GGANTYYPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLYFDY  
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYTPEPVTVSWNS  
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKR  
VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPE  
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL  
HNHYTQKSI.SI.SI.GK

SEQID NO: 11

#### H005-1 LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASQTIGTWLWYQQKPGKAPKLLIYTATSLA  
DGVPSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQVYSIPWTFGGGTKVEIKRTVA  
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSKDSSTYSLSLTITLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQID NO: 12

Последовательность HC гуманизованного антитела H005-1 с привитым мышиним CDR представляет собой (SEQID NO: 11), последовательность LC гуманизованного антитела представляет собой (SEQ ID NO: 12). Сайты, которые могут влиять на активность антител, подвергали точечным мутациям, последовательности являются следующими:

	HC	LC
H005-1	SEQID NO: 11	SEQID NO: 12
H005-2	SEQID NO: 11, G44R	SEQID NO: 12
H005-3	SEQID NO: 11	SEQID NO: 12, A43S
H005-4	SEQID NO: 11, G44R	SEQID NO: 12, A43S

кДНК синтезировали в соответствии с аминокислотными последовательностями легкой цепи и тяжелой цепи каждого гуманизованного антитела (SEQ NO 11, SEQ NO 12 и их варианты). После расщепления кДНК с помощью XhoI и BamHI, полученные фрагменты кДНК встраивали в экспрессионные векторы pcDNA3.1 (Life Technologies

номер по каталогу V790-20) на сайтах рестрикции BamHI/XhoI. Экспрессионные векторы и реагент для трансфекции PEI (Polysciences, Inc. номер по каталогу 23966) использовали для трансфекции клеток НЕК293 (Life Technologies номер по каталогу № 11625019) в соотношении 1: 2, и трансфицированные клетки инкубировали в термостате с CO<sub>2</sub> в течение 4–5 суток. Экспрессированные антитела выделяли центрифугированием и очищали в соответствии с общепринятым способом с получением гуманизированных антител по настоящему изобретению.

### **Пример 8: Данные об активности гуманизированных антител**

Выполняли *in vitro* анализ ИФА связывания гуманизированных антител (способ соответствует описанному в Примере 2), анализ блокирования связывания лиганда (способ соответствует описанному в Примере 2) и эксперименты по кинетике аффинности (способ соответствует описанному в Примере 5). Результаты приведены в следующей таблице:

Исследуемое антитело	ИФА, EC50, нМ	Анализ LBB, IC50, нМ	KD(M)
H005-1	0,11	1,27	2,79E-09
H005-2	0,14	1,27	2,98E-09
H005-3	0,15	1,33	2,45E-09
H005-4	0,14	1,36	3,89E-09

Результаты показали, что гуманизированные антитела H005-1, H005-2, H005-3 и H005-4 сохраняли активность связывания с PD-1, с показателями кинетики аффинности KD 2,79, 2,98, 2,45 и 3,89 нМ, соответственно. Одновременно с этим все гуманизированные антитела демонстрировали эффективность блокирующей активности в отношении пути PD-L1/PD-1.

### **Пример 9: Ингибирование роста опухолевых клеток антителом к PD-1**

#### **1. Материалы эксперимента:**

Клетки U87MG (клетки глиомы): приобретали в банке клеток Китайской академии наук, номер по каталогу TCHu138;

МКПК (моноклеарные клетки периферической крови человека) приобретали в

центре крови в Шанхае (Shanghai Blood Center);

CD3: приобретали у Miltenyi Biotec, номер по каталогу 130-093-387;

CD28: приобретали у Miltenyi Biotec, номер по каталогу 130-093-375;

Набор для подсчета клеток Cell Counting Kit-8: приобретали у DOJINDO LABORATORIES, номер по каталогу СК04;

mIgG (отрицательный контроль): приобретали у SANTA CRUZ номер по каталогу sc-2025; используемая доза 1660 нг/мл.

## **2. Способы эксперимента:**

1) Клетки U87MG культивировали в среде EMEM, содержащей 10 % FBS и 1 % P/S, инкубировали в 96-луночной планшете в количестве  $1 \times 10^4$  клеток на лунку.

2) Антитело H005-1 разводили до различных градиентов концентрации (как показано на оси абсцисс Фиг. 3) с использованием PBS, добавляли в 96-луночный планшет в количестве 10 мкл/лунку и инкубировали в термостате при 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> в течение 4 часов.

3) После адгезии клеток в каждую лунку добавляли 80 мкл суспензии клеток МКПК с плотностью клеток  $2 \times 10^4$  клеток/лунке и в каждую лунку добавляли 10 мкл антитела CD3 и антитела CD28, конечные концентрации обеих антител CD3 и CD28 составили 500 нг/мл.

4) После 72 часов инкубации в термостате при 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> в каждую лунку для развития добавляли 10 мкл ССК8. Через 2 часа определяли OD450.

## **3. Результаты:**

Результат показан на фигуре 3; по сравнению с mIgG (отрицательный контроль) различные концентрации антитела к PD-1 (H005-1) оказывали значительное ингибирующее действие на рост клеток U87MG, и степень ингибирования при самой высокой концентрации составляла около 30 %.

### **Пример 10: Активность H005-1 в отношении пролиферации стимулированных туберкулином МКПК**

Определяли активность гуманизированного антитела H005-1 в отношении пролиферации стимулированных туберкулином МКПК *in vitro*.

К 15 мл свежих МКПК, около  $3 \times 10^7$  клеток, добавляли 20 мкл туберкулина (Shanghai BiYou Biotechnology, номер по каталогу 97-8800), и смесь инкубировали в термостате в течение 5 дней при температуре 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>. На 6-й день культивированные клетки центрифугировали и ресуспендировали в свежей среде и доводили плотность до  $5 \times 10^5$  клеток/мл. 190 мкл ресуспендированных клеток высевали в каждую лунку 96-луночного планшета. Гуманизированное антитело H005-1 добавляли в соответствующие лунки 96-луночного планшета в количестве 10 мкл/лунка. Контрольную группу и пустую группу добавляли с 10 мкл PBS. Планшет для культивирования клеток инкубировали в термостате при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>, а спустя 72 часа определяли пролиферацию МКПК (Promega, номер по каталогу G7571) и секрецию ИФН-γ (Neo Bioscience, номер по каталогу ENC102g). Получили следующие результаты:

**Активирующее влияние исследуемого образца на пролиферацию стимулированных туберкулином МКПК и секрецию ИФН-γ**

Образец	Пролиферация Т-клеток, EC50 (нг/мл)	ИФН-λ, EC50(нг/мл)
H005-1	15,95 ± 17,15	56,87 ± 48,53

Примечание: n = 4

Результаты эксперимента показали, что гуманизированное антитело H005-1 превосходно активирует стимулированную экзогенным туберкулином пролиферацию МКПК и секрецию ИФН-γ.

**Пример 11: Ингибирование подкожно привитой опухоли U-87MG антителом H005-1**

100 мкл клеток U87 ( $5 \times 10^6$  клеток) прививали подкожно в правое подреберье мышам линии SCID-Beige. После того как через 7–10 дней опухоль вырастала до 80–100 мм<sup>3</sup>, мышей линии SCID-Beige за исключением тех, которые имели слишком большую или слишком маленькую массу тела или опухоли, случайным образом распределяли в группу, которой вводили H005-1 в дозе 10 мг/кг, и в группу, которой вводили IgG человека в дозе 10 мг/кг, в зависимости от объема опухоли, причем каждая группа состояла из семи мышей (D0). Два типа МКПК, стимулированных антителом к CD3 в течение 3 суток,

смешивали в соотношении 1: 1, и вводили посредством инъекции в опухолевые ткани в концентрации  $5 \times 10^5$  клеток/60 мкл, в то же время подкожно вводили инъекцию исследуемого антитела, один раз в 7 дней, всего 3 дозы. Два раза в неделю у мышей измеряли объем опухоли и взвешивали их. Данные регистрировали. Объем опухоли (V) рассчитывали как:  $V = 1/2 \times a \times b^2$ , где a и b соответственно представляют длину и ширину.

Результаты, показанные на Фигуре 4: изменение объема опухоли после лечения, и на Фигуре 5: изменение массы тела мышей после лечения, указывают, что антитело H005-1 превосходно ингибирует рост опухоли U87MG и не оказывает влияние на массу тела мышей.

SEQL.txt  
ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD., JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.

<120> Антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент и их медицинское применение

<130> 740033CPCT

<150> PCT/CN2014/091090

<151> 2014-11-14

<150> CN 201310681942.6

<151> 2013-12-12

<160> 14

<170> PatentIn версия 3.3

<210> 1

<211> 399

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный химерный белок, состоящий из внеклеточного домена PD-1 и FC

<400> 1

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg  
20 25 30

Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu  
35 40 45

Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser  
50 55 60

Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys  
65 70 75 80

Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg  
85 90 95

Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val  
100 105 110

Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile  
115 120 125

Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu  
130 135 140

Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro



SEQL.txt

<400> 2

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln  
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp  
20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp  
35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val  
50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala  
65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg  
85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg  
100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu  
115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val  
130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro  
145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly  
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys  
180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro  
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly  
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro  
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly  
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg  
260 265 270

SEQL.txt

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu  
275 280 285

<210> 3  
<211> 5  
<212> ПРТ  
<213> Mus musculus HCDR1

<400> 3

Ser Tyr Met Met Ser  
1 5

<210> 4  
<211> 17  
<212> ПРТ  
<213> Mus musculus HCDR2

<400> 4

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

Gly

<210> 5  
<211> 7  
<212> ПРТ  
<213> Mus musculus HCDR3

<400> 5

Gln Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 6  
<211> 11  
<212> ПРТ  
<213> Mus musculus LCDR1

<400> 6

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Thr  
1 5 10

<210> 7  
<211> 7  
<212> ПРТ  
<213> Mus musculus LCDR2

<400> 7

Thr Ala Thr Ser Leu Ala Asp  
1 5

<210> 8  
<211> 9  
<212> ПРТ

<213> Mus musculus LCDR3

<400> 8

Gln Gln Val Tyr Ser Ile Pro Trp Thr  
1 5

<210> 9

<211> 116

<212> ПРТ

<213> Mus musculus vVH

<400> 9

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Met Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gln Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 10

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Mus musculus VL

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Glu Gly Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp  
20 25 30

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

Tyr Thr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

SEQL.txt

Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 11

<211> 443

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность тяжелой цепи гуманизированного антитела H005-1

<400> 11

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Met Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gln Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala  
115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

SEQL.txt

Gly Leu Tyr Ser<sub>180</sub> Leu Ser Ser Val Val<sub>185</sub> Thr Val Pro Ser Ser<sub>190</sub> Ser Leu

Gly Thr Lys<sub>195</sub> Thr Tyr Thr Cys Asn<sub>200</sub> Val Asp His Lys Pro<sub>205</sub> Ser Asn Thr

Lys Val<sub>210</sub> Asp Lys Arg Val Glu<sub>215</sub> Ser Lys Tyr Gly Pro<sub>220</sub> Pro Cys Pro Pro

Cys<sub>225</sub> Pro Ala Pro Glu Ala<sub>230</sub> Ala Gly Gly Pro Ser<sub>235</sub> Val Phe Leu Phe Pro<sub>240</sub>

Pro Lys Pro Lys Asp<sub>245</sub> Thr Leu Met Ile Ser<sub>250</sub> Arg Thr Pro Glu Val<sub>255</sub> Thr

Cys Val Val<sub>260</sub> Val Asp Val Ser Gln Glu<sub>265</sub> Asp Pro Glu Val Gln<sub>270</sub> Phe Asn

Trp Tyr Val<sub>275</sub> Asp Gly Val Glu<sub>280</sub> Val His Asn Ala Lys Thr<sub>285</sub> Lys Pro Arg

Glu Glu<sub>290</sub> Gln Phe Asn Ser Thr<sub>295</sub> Tyr Arg Val Val Ser<sub>300</sub> Val Leu Thr Val

Leu<sub>305</sub> His Gln Asp Trp Leu<sub>310</sub> Asn Gly Lys Glu Tyr<sub>315</sub> Lys Cys Lys Val Ser<sub>320</sub>

Asn Lys Gly Leu Pro<sub>325</sub> Ser Ser Ile Glu Lys<sub>330</sub> Thr Ile Ser Lys Ala<sub>335</sub> Lys

Gly Gln Pro Arg<sub>340</sub> Glu Pro Gln Val Tyr<sub>345</sub> Thr Leu Pro Pro Ser<sub>350</sub> Gln Glu

Glu Met Thr<sub>355</sub> Lys Asn Gln Val Ser<sub>360</sub> Leu Thr Cys Leu Val<sub>365</sub> Lys Gly Phe

Tyr Pro<sub>370</sub> Ser Asp Ile Ala Val<sub>375</sub> Glu Trp Glu Ser Asn<sub>380</sub> Gly Gln Pro Glu

Asn<sub>385</sub> Asn Tyr Lys Thr Thr<sub>390</sub> Pro Pro Val Leu Asp<sub>395</sub> Ser Asp Gly Ser Phe<sub>400</sub>

Phe Leu Tyr Ser Arg<sub>405</sub> Leu Thr Val Asp Lys<sub>410</sub> Ser Arg Trp Gln Glu<sub>415</sub> Gly

Asn Val Phe Ser<sub>420</sub> Cys Ser Val Met His<sub>425</sub> Glu Ala Leu His Asn<sub>430</sub> His Tyr

Thr Gln Lys<sub>435</sub> Ser Leu Ser Leu Ser<sub>440</sub> Leu Gly Lys

SEQL.txt

<210> 12  
 <211> 214  
 <212> ПРТ  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> последовательность легкой цепи гуманизированного антитела H005-1

<400> 12

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp  
 20 25 30

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

Tyr Thr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 13  
 <211> 109

SEQL.txt

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность каркасного участка тяжелой цепи гуманизированного антитела

<400> 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
100 105

<210> 14

<211> 98

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность каркасного участка легкой цепи гуманизированного антитела

<400> 14

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

SEQL.txt  
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu  
85 90 95

Ile Lys

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

1. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

вариабельную область легкой цепи, содержащую по меньшей мере одну LCDR, выбранную из последовательностей, представленных в: SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8; и

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере одну область HCDR, выбранную из последовательностей, представленных в: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

2. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 6.

3. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что вариабельная область легкой цепи содержит LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 7.

4. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что вариабельная область легкой цепи содержит LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 8.

5. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 3.

6. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 4.

7. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 5.

8. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3,

представленные в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, соответственно.

9. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, соответственно.

10. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, соответственно; и при этом переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, соответственно.

11. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–10, отличающиеся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой мышиное антитело или его фрагмент.

12. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–10, отличающиеся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой химерное антитело или его фрагмент.

13. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 12, отличающиеся тем, что последовательность переменной области легкой цепи химерного антитела представляет собой: SEQ ID NO: 10.

14. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 12, отличающиеся тем, что последовательность переменной области тяжелой цепи химерного антитела представляет собой: SEQ ID NO: 9.

15. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–10, отличающиеся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизованное антитело или его фрагмент.

16. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 15, отличающиеся тем, что последовательность FR легкой цепи переменной области легкой цепи гуманизованного антитела получена из комбинации последовательности легких цепей зародышевой линии человека IGKV1-39 и JK4, представленной в SEQ ID NO: 14, содержащей FR1, FR2 и FR3 IGKV 1-39 и FR4 JK4.

17. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 15, отличающиеся тем, что последовательность легкой цепи гуманизированного антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12 или ее вариант; причем указанный вариант предпочтительно содержит аминокислотную мутацию 0–10 в вариабельной области легкой цепи, более предпочтительно A43S.

18. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 15, отличающиеся тем, что вариабельная область тяжелой цепи гуманизированного антитела дополнительно содержит FR тяжелой цепи человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, или его вариант, предпочтительно FR тяжелой цепи человеческого IgG2 или IgG4.

19. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 15, отличающиеся тем, что последовательность FR тяжелой цепи вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела получена из комбинации последовательности тяжелых цепей зародышевой линии человека IgHV3-7 и JH6, представленной в SEQ ID NO: 13, содержащей FR1, FR2 и FR3 IgHV3-7 и FR4 JH6.

20. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 15, отличающиеся тем, что последовательность тяжелой цепи гуманизированного антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11 или ее вариант; причем указанный вариант предпочтительно содержит аминокислотную мутацию 0–10 в вариабельной области тяжелой цепи, более предпочтительно G44R.

21. Молекула ДНК, кодирующая антитело по любому из пп. 1–20.

22. Экспрессионный вектор, содержащий молекулу ДНК по п. 21.

23. Клетка-хозяин, трансформированная экспрессионным вектором по п. 22.

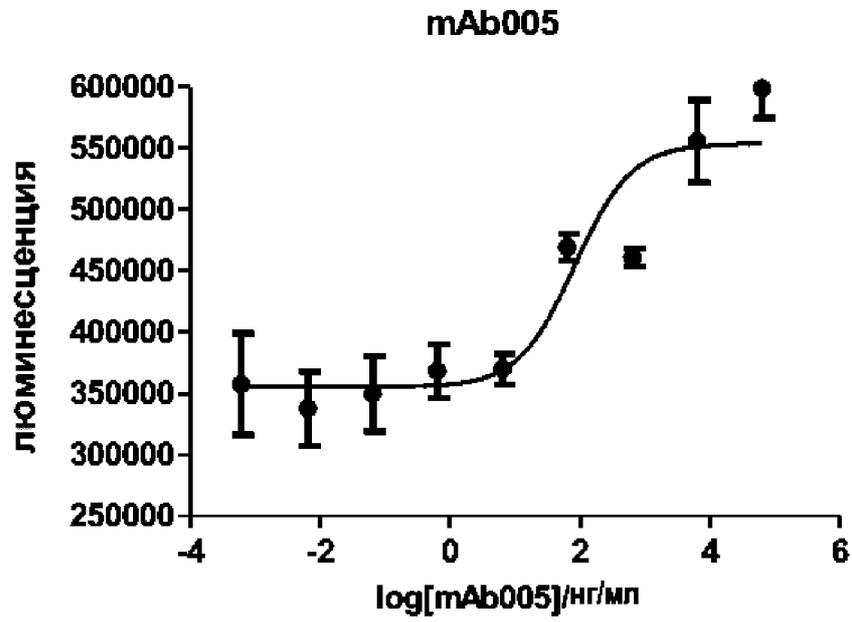
24. Клетка-хозяин по п. 23, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой бактерию, предпочтительно *E. coli*.

25. Клетка-хозяин по п. 23, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой дрожжи, предпочтительно *Pichia pastoris*.

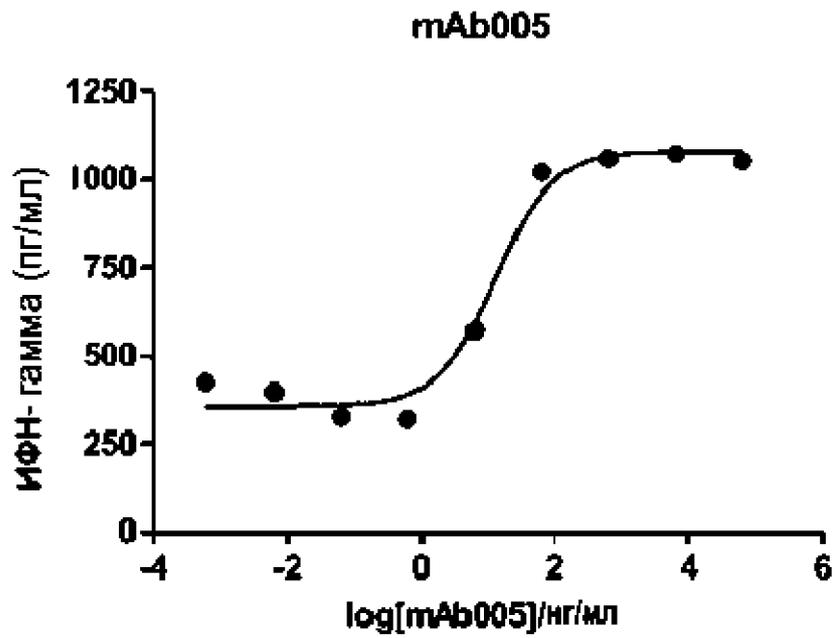
26. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к PD-1 или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–20 и фармацевтически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель.

27. Применение антитела к PD-1 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1–20 и фармацевтической композиции по п. 26 при получении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, опосредованного PD-1, причем указанное заболевание или расстройство предпочтительно представляет собой рак, более предпочтительно рак, экспрессирующий PD-L1, наиболее предпочтительно рак молочной железы, рак легкого, рак желудка, рак кишечника, рак почки, меланому и немелкоклеточный рак легкого, и наиболее предпочтительно немелкоклеточный рак легкого, меланому и рак почки.

По доверенности

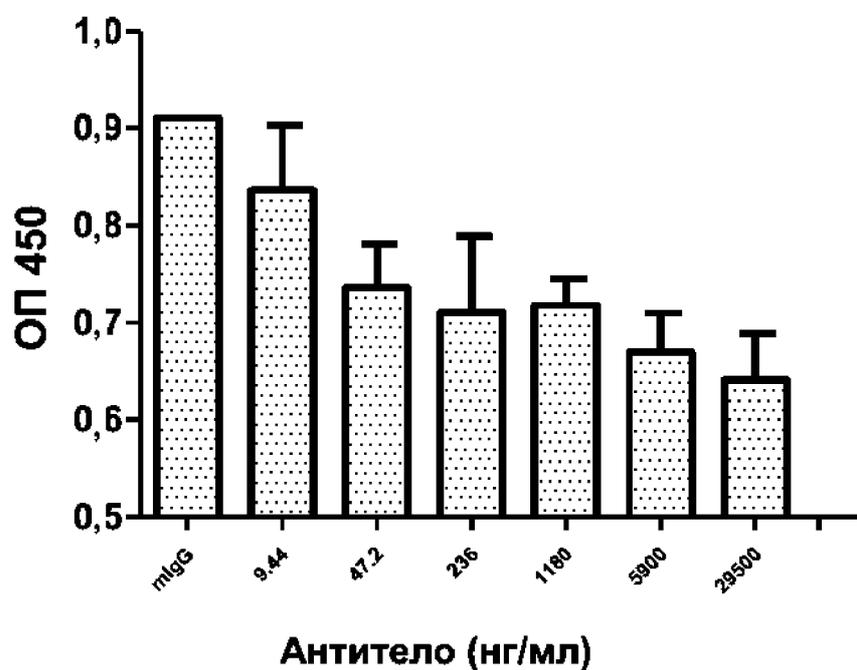


Фигура 1

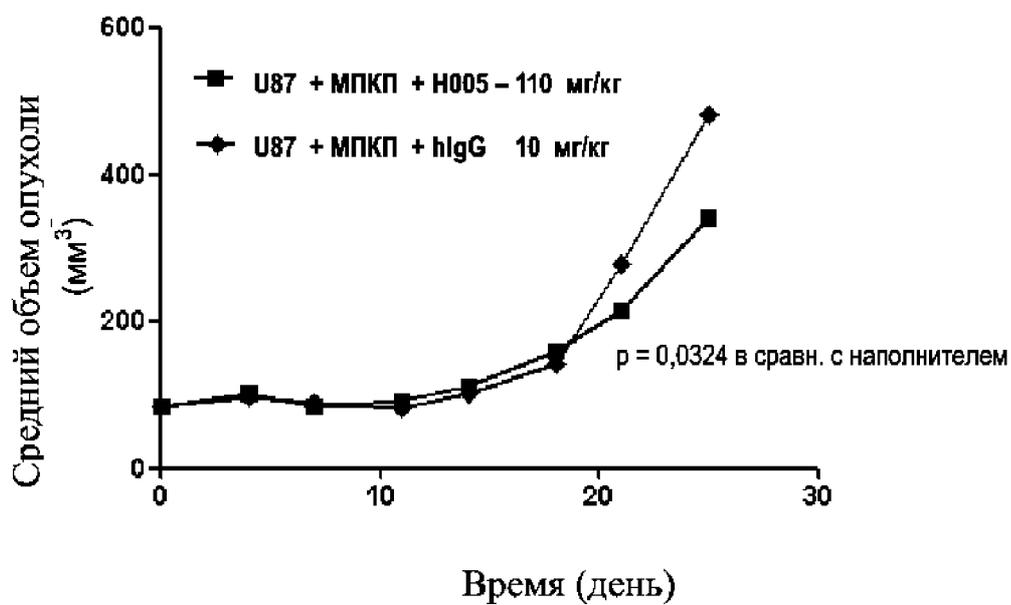


Фигура 2

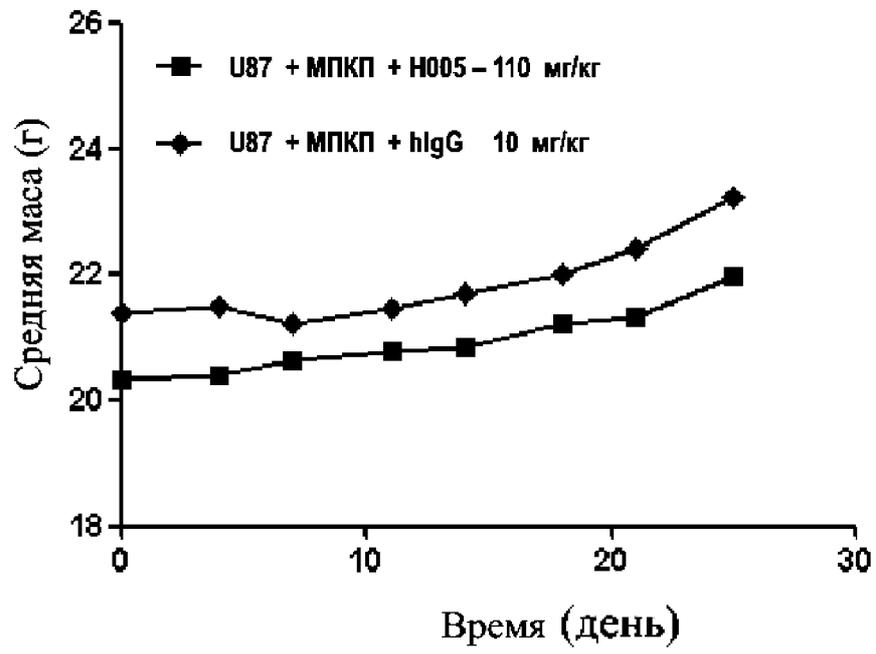
### Анализ пролиферации U87MG



Фигура 3



Фигура 4



Фигура 5