

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201990741** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2019.11.29

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.11.01

(54) **АНТИТЕЛА, НАПРАВЛЕННЫЕ ПРОТИВ БЕЛКА-1 ЗАПРОГРАММИРОВАННОЙ СМЕРТИ (PD-1)**

(31) **62/416,128; 62/427,777**

(32) **2016.11.01; 2016.11.29**

(33) **US**

(86) **PCT/US2017/059618**

(87) **WO 2018/085468 2018.05.11**

(71) Заявитель:

**АНАПТИСБИО, ИНК.; ТЕСАРО,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Кинг Дэвид Дж., Кери Мэрилин, Хуан
Баочуань (US)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) В настоящем изобретении предусмотрены средства на основе антитела, которые связываются с белком-1 запрограммированной смерти (PD-1). В явной форме предусмотрены конкретные последовательности полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина и полипептида легкой цепи иммуноглобулина. Также представлены связанные с ними нуклеиновые кислоты, векторы, композиции и способы применения средства на основе антитела к PD-1 для лечения нарушения или заболевания, которое реагирует на ингибирование PD-1, такого как рак или инфекционное заболевание.

A1

201990741

201990741

A1

**АНТИТЕЛА, НАПРАВЛЕННЫЕ ПРОТИВ БЕЛКА-1
ЗАПРОГРАММИРОВАННОЙ СМЕРТИ (PD-1)**

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительным заявкам на патент США с порядковыми №№ 62/416128, поданной 1 ноября 2016 года, и 62/427777, поданной 29 ноября 2016 года, содержание обеих из которых тем самым включено посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[2] Рак представляет собой серьезную проблему общественного здравоохранения, причем ожидается, что около 595690 человек умрут от рака в Соединенных Штатах Америки только в 2016 году по оценкам Американского общества по борьбе с раком, Cancer Facts & Figures 2016 (<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf>).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[3] Белок-1 запрограммированной смерти (PD-1) (также известный как белок-1 запрограммированной смерти клеток) представляет собой трансмембранный белок I типа из 268 аминокислот, изначально идентифицированный посредством вычитающей гибридизации в линии Т-клеток мыши, претерпевающих апоптоз (Ishida et al., *Embo J.*, 11: 3887–95 (1992)). PD-1 является представителем семейства CD28/CTLA-4 Т-клеточных регуляторов и экспрессируется на активированных Т-клетках, В-клетках и клетках миелоидной линии дифференцировки (Greenwald et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 23: 515–548 (2005); и Sharpe et al., *Nat. Immunol.*, 8: 239–245 (2007)).

[4] Были идентифицированы два лиганда для PD-1, лиганд-1 для PD (PD-L1) и лиганд-2 для PD (PD-L2), оба принадлежащие надсемейству белка B7 (Greenwald et al, выше). PD-L1 экспрессируется у различных типов клеток, включая клетки легкого, сердца, тимуса, селезенки и почки (см., например, Freeman et al., *J. Exp. Med.*, 192(7):

1027–1034 (2000); и Yamazaki et al., *J. Immunol.*, 169(10): 5538–5545 (2002)). Экспрессия PD-L1 активируется на макрофагах и дендритных клетках (DC) в ответ на обработку липополисахаридом (LPS) и GM-CSF, а также на Т-клетках и В-клетках при передаче сигнала через Т-клеточные и В-клеточные рецепторы. PD-L1 также экспрессируется у различных линий опухолевых клеток мыши (см., например, Iwai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(9): 12293–12297 (2002); и Blank et al., *Cancer Res.*, 64(3): 1140–1145 (2004)). В отличие от этого, PD-L2 проявляет более ограниченный паттерн экспрессии и экспрессируется, главным образом, антигенпрезентирующими клетками (например, дендритными клетками и макрофагами) и некоторыми линиями опухолевых клеток (см., например, Latchman et al., *Nat. Immunol.*, 2(3): 261–238 (2001)). Высокий уровень экспрессии PD-L1 в опухолях, будь то на опухолевой клетке, строме или других клетках в пределах опухолевого микроокружения, коррелирует с неблагоприятным клиническим прогнозом, предположительно за счет ингибирования эффекторных Т-клеток и активации регуляторных Т-клеток (Treg) в опухоли.

[5] PD-1 негативно регулирует активацию Т-клеток, и данная ингибиторная функция связана с иммунорецепторным мотивом переключения на основе тирозина (ITSM) в цитоплазматическом домене (см., например, Greenwald et al., *выше*; и Parry et al., *Mol. Cell. Biol.*, 25: 9543–9553 (2005)). Недостаточность PD-1 может приводить к аутоиммунитету. Например, было показано, что у мышей C57BL/6 с нокаутом гена PD-1, развивается волчанкоподобный синдром (см., например, Nishimura et al., *Immunity*, 11: 141–1151 (1999)). У человека однонуклеотидный полиморфизм в гене PD-1 ассоциирован с более высокой заболеваемостью системной красной волчанкой, диабетом 1 типа, ревматоидным артритом и прогрессированием рассеянного склероза (см., например, Nielsen et al., *Tissue Antigens*, 62(6): 492–497 (2003); Bertias et al., *Arthritis Rheum.*, 60(1): 207–218 (2009); Ni et al., *Hum. Genet.*, 121(2): 223–232 (2007); Tahoori et al., *Clin. Exp. Rheumatol.*, 29(5): 763–767 (2011); и Kroner et al., *Ann. Neurol.*, 58(1): 50–57 (2005)). Аномальная экспрессия PD-1 также участвует в дисфункциях Т-клеток при некоторых патологиях, таких как иммунная эвазия опухоли и хронические вирусные инфекции (см., например, Barber et al., *Nature*, 439: 682–687 (2006); и Sharpe et al., *выше*).

[6] Последние исследования демонстрируют, что супрессия Т-клеток, индуцированная PD-1, также играет роль в супрессии противоопухолевого

иммунитета. Например, PD-L1 экспрессируется на различных опухолях человека и мыши, а связывание PD-1 с PD-L1 на опухолях приводит к супрессии Т-клеток, а также эвазии и защите опухолей (Dong et al., *Nat. Med.*, 8: 793–800 (2002)). Экспрессия PD-L1 опухолевыми клетками напрямую ассоциирована с их устойчивостью к лизису под действием противоопухолевых Т-клеток *in vitro* (Dong et al., *выше*; и Blank et al., *Cancer Res.*, 64: 1140–1145 (2004)). Мыши с нокаутом гена PD-1 устойчивы к введению опухолевых клеток (Iwai et al., *Int. Immunol.*, 17: 133–144 (2005)), а Т-клетки от мышей с нокаутом гена PD-1 очень эффективны в отторжении опухоли при адоптивном переносе мышам, несущим опухоль (Blank et al., *выше*). Блокирование ингибиторных сигналов PD-1 с применением моноклонального антитела может стимулировать противоопухолевый иммунитет хозяина у мышей (Iwai et al., *выше*; и Hirano et al., *Cancer Res.*, 65: 1089–1096 (2005)), а высокие уровни экспрессии PD-L1 в опухолях ассоциированы с неблагоприятным прогнозом для многих типов рака человека (Hamanishi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 3360–3365 (2007), Brown et al., *J. Immunol.*, 170: 1257–1266 (2003); и Flies et al., *Yale Journal of Biology and Medicine*, 84(4): 409–421 (2011)).

[7] Ввиду вышеизложенного для лечения различных типов рака были разработаны стратегии ингибирования активности PD-1, а также стратегии иммунопотенцирования (например, для лечения инфекционных заболеваний) (см., например, Ascierto et al., *Clin. Cancer Res.*, 19(5): 1009–1020 (2013)). При этом для лечения рака были разработаны моноклональные антитела, нацеливающиеся на PD-1 (см., например, Weber, *Semin. Oncol.*, 37(5): 430–4309 (2010); и Tang et al., *Current Oncology Reports*, 15(2): 98–104 (2013)). Например, ниволумаб (также известный как BMS-936558) приводил к полному или частичному ответам при немелкоклеточном раке легкого, меланоме и почечноклеточном раке в фазе I клинического испытания (см., например, Topalian, *New England J. Med.*, 366: 2443–2454 (2012)), а в настоящее время он проходит фазу III клинических испытаний. MK-3575 представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, направленное против PD-1, которое продемонстрировало признаки противоопухолевой активности в фазе I клинических испытаний (см., например, Patnaik et al., *2012 American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting*, Abstract # 2512). Кроме того, последние данные свидетельствуют о том, что терапевтические средства, нацеливающиеся на PD-1, могут

усиливать иммунные ответы против патогенов, таких как HIV (см., например, Potichis et al., *Curr. HIV/AIDS Rep.*, 9(1): 81–90 (2012)). Однако, несмотря на эти успехи, эффективность данных потенциальных терапевтических средств у человека может быть ограничена.

[8] Существует потребность в дополнительных антагонистах PD-1 (например, антителе), которые связывают PD-1 с высокой аффинностью и эффективно нейтрализуют активность PD-1.

[9] В настоящем изобретении предусмотрены средства на основе антител и различные композиции и способы, связанные с ними, включая, например, полипептиды, нуклеиновые кислоты, клетки, а также различные методики и т. д.

[10] В настоящем изобретении предусмотрены новые антитела, которые связываются с PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела по настоящему изобретению связываются с PD-1 с высокой аффинностью и эффективно нейтрализуют активность PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления в явной форме предусмотрены последовательности полипептида тяжелой цепи (SEQ ID NO:1) и полипептида легкой цепи (SEQ ID NO:2) антитела.

[11] В настоящем изобретении предусмотрен полипептид или выделенный полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:1. Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрен полипептид или выделенный полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% совокупной идентичностью с последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:1. Согласно некоторым вариантам осуществления отличия последовательности относительно последовательности, изложенной под SEQ ID NO:1, не находятся в пределах CDR. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид или выделенный полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит все три CDR из SEQ ID NO:1. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид или полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит сигнальный пептид. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид или полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина, который

содержит сигнальный пептид, имеет аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO:5.

[12] Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный полипептид или полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой или содержит полипептид IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный полипептид или полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит полипептид IGHG4*01 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный полипептид или полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит одну или более мутаций в пределах области тяжелой цепи IgG. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный полипептид или полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит константную область тяжелой цепи IgG4 с одной или более мутациями в константной области тяжелой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный полипептид или полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит константную область тяжелой цепи IgG4 с одной или более мутациями в шарнирной области. Предполагается, что согласно некоторым вариантам осуществления мутация в шарнирной области IgG4 может предотвращать обмен половиной молекулы с другими молекулами IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или более мутаций в шарнирной области IgG4 могут предусматривать стабилизирующую мутацию серина в пролин, которая предотвращает обмен половиной молекулы с другими молекулами IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или более мутаций в шарнирной области IgG4 могут предусматривать мутацию S228P. См., например, J. Biol. Chem. 2015; 290(9):5462–5469.

[13] В настоящем изобретении предусмотрен полипептид или выделенный полипептид легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:2. Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрен полипептид или выделенный полипептид легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% совокупной идентичностью с последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:2. Согласно некоторым вариантам осуществления отличия последовательности относительно последовательности, изложенной под SEQ ID NO:2, не находятся в пределах CDR.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид или выделенный полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержит все три CDR из SEQ ID NO:2. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный полипептид или полипептид легкой цепи иммуноглобулина представляет собой легкую каппа-цепь. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный полипептид или полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержит полипептид IGKC*01 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид или полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержит сигнальный пептид. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид или полипептид легкой цепи иммуноглобулина, который содержит сигнальный пептид, имеет аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO:6.

[14] Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрено средство на основе антитела к PD-1, содержащее по меньшей мере одну тяжелую цепь иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:1, и по меньшей мере одну легкую цепь иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:2. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 содержит две тяжелых цепи иммуноглобулина, причем каждую с аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:1. В качестве альтернативы или дополнения, согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 содержит две легких цепи иммуноглобулина, причем каждую с аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:2. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 имеет формат канонического антитела.

[15] Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренное средство на основе тяжелой цепи, легкой цепи и/или антитела является гликозилированным по одному или нескольким сайтам. Согласно некоторым вариантам осуществления гликан связан с Fc-областью через атом N. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела гликозилировано по Asn297 (нумерация по Kabat).

[16] Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая одну или более гликоформ средства на основе тяжелой цепи, легкой цепи и/или антитела, описываемого в данном документе. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренная композиция содержит несколько гликоформ, присутствующих в указанных абсолютных и/или относительных количествах. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрены композиции, которые могут практически не содержать одну или более конкретных гликоформ средства на основе тяжелой цепи, легкой цепи и/или антитела, описываемого в данном документе.

[17] Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренное средство на основе тяжелой цепи, легкой цепи и/или антитела имеет структуру, которая содержит одну или более дисульфидных связей. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или более дисульфидных связей представляют собой или предусматривают дисульфидную связь в ожидаемом положении иммуноглобулина IgG4.

[18] Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 вводится с другим средством на основе антитела, таким как средство, специфическое в отношении гена-3 активации лимфоцитов (LAG-3) или белка-3, содержащего домен Т-клеточного иммуноглобулина и домен муцина (TIM-3).

[19] Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела связывается с PD-1 и другим антигеном, что дает в результате средство на основе антитела с «двойной реактивностью» (например, биспецифическое антитело). Например, средство на основе антитела может связываться с PD-1 и другим негативным регулятором иммунной системы, таким как, например, ген-3 активации лимфоцитов (LAG-3) или белок-3, содержащий домен Т-клеточного иммуноглобулина и домен муцина (TIM-3).

[20] Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрены выделенные или очищенные последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие вышеупомянутые полипептиды иммуноглобулина, векторы, содержащие такие последовательности нуклеиновой кислоты, выделенные средства на основе антитела к PD-1, содержащие вышеупомянутые полипептиды иммуноглобулина, последовательности нуклеиновой

кислоты, кодирующие такие средства на основе антитела к PD-1, векторы, содержащие такие последовательности нуклеиновой кислоты, выделенные клетки, содержащие такие векторы, композиции, содержащие такие средства на основе антитела к PD-1 или такие векторы с фармацевтически приемлемым носителем, а также способы лечения рака или инфекционных заболеваний у млекопитающих путем введения эффективных количеств таких композиций млекопитающим.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[21] Графические материалы, которые состоят из следующих фигур, включены в данный документ исключительно с целью иллюстрации, а не для ограничения.

[22] На *фигуре 1* показан график, изображающий занятость рецепторов у РВМС человека и яванского макака иллюстративным средством на основе антитела к PD-1.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ОПРЕДЕЛЕННЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[23] В настоящем изобретении предусмотрены, по меньшей мере частично, средства на основе антител и различные композиции и способы, связанные с ними, включая, например, полипептиды, нуклеиновые кислоты, клетки, а также различные методики и т. д. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению связываются с PD-1 с высокой аффинностью и эффективно нейтрализуют активность PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления в явной форме предусмотрена последовательность полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина (SEQ ID NO:1 и 5) и полипептида легкой цепи иммуноглобулина (SEQ ID NO:2 и 6). Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина и/или полипептид легкой цепи иммуноглобулина является выделенным. Используемый в данном документе термин «иммуноглобулин» или «антитело» относится к белку, встречающемуся в крови или других физиологических жидкостях позвоночных, который используется иммунной

системой для идентификации и нейтрализации чужеродных объектов, таких как бактерии и вирусы. Полноразмерный иммуноглобулин, как правило, состоит из четырех полипептидов: двух идентичных копий полипептида тяжелой (H) цепи и двух идентичных копий полипептида легкой (L) цепи. Каждая тяжелая цепь содержит одну N-концевую вариабельную (V_H) область и три C-концевых константных (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}) области, а каждая легкая цепь содержит одну N-концевую вариабельную (V_L) область и одну C-концевую константную (C_L) область. Легкие цепи иммуноглобулина могут принадлежать к одному из двух различных типов, либо каппа (κ), либо лямбда (λ), в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов. В типичном иммуноглобулине каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью дисульфидными связями, и две тяжелых цепи связаны друг с другом дисульфидными связями. Вариабельная область легкой цепи совпадает с вариабельной областью тяжелой цепи, а константная область легкой цепи совпадает с первой константной областью тяжелой цепи. Остальные константные области тяжелых цепей совпадают друг с другом.

[24] Вариабельные области каждой пары легкой и тяжелой цепей образуют антигенсвязывающий сайт антитела. Области V_H и V_L имеют одинаковую общую структуру, при этом каждая область содержит четыре каркасных области (FW или FR), соединенные тремя определяющими комплементарность областями (CDR). Используемый в данном документе термин «каркасная область» относится к относительно консервативным аминокислотным последовательностям в пределах вариабельной области, которые расположены между гипервариабельными или определяющими комплементарность областями (CDR). В типичном иммуноглобулине в каждом вариабельном домене имеются четыре каркасных области, обозначаемые FR1, FR2, FR3 и FR4. Каркасные области образуют β -складки, обеспечивающие структурный каркас вариабельной области (см., например, C.A. Janeway et al. (eds.), *Immunobiology, 5th Ed.*, Garland Publishing, New York, NY (2001)).

[25] В типичном иммуноглобулине в каждом вариабельном домене имеются три определяющих комплементарность области (CDR), обозначаемые CDR1, CDR2 и CDR3. CDR образуют «гипервариабельную область» антитела, которая отвечает за связывание с антигеном. CDR образуют петли, соединяющие, а в некоторых случаях,

и содержащие часть β -складчатой структуры, образованной каркасными областями. Хотя константные области легкой и тяжелой цепей не участвуют в непосредственном связывании антитела с антигеном, константные области могут влиять на ориентацию переменных областей. Константные области также проявляют различные эффекторные функции, например, участвуют в антитело-зависимом комплемент-опосредуемом лизисе или антитело-зависимой клеточной токсичности за счет взаимодействий с эффекторными молекулами и клетками.

[26] В настоящем изобретении предусмотрены, по меньшей мере частично, средства на основе антитела, которые связываются с PD-1. Используемый в данном документе термин «средство на основе антитела» относится к средству, которое специфически связывается с конкретным антигеном. Согласно некоторым вариантам осуществления данный термин охватывает любой полипептид или полипептидный комплекс, который содержит структурные элементы иммуноглобулина, достаточные для обеспечения специфического связывания. Иллюстративные средства на основе антитела предусматривают без ограничения моноклональные антитела или поликлональные антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела может содержать одну или более последовательностей константной области, которые характерны для антител мыши, кролика, примата или человека. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела может содержать один или более элементов последовательности, являющихся гуманизированными, приматизированными, химерными и т. д., как известно из уровня техники. Согласно многим вариантам осуществления термин «средство на основе антитела» используется для обозначения одной или более известных из уровня техники или разработанных конструкций или форматов для использования структурных и функциональных признаков антитела в альтернативном представлении. Например, согласно вариантам осуществления средство на основе антитела, используемое в соответствии с настоящим изобретением, имеет формат, выбранный без ограничения из интактных антител IgA, IgG, IgE или IgM; би- или мультиспецифических антител (например, Zybodyes[®] и т. п.); фрагментов антитела, таких как Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, Fd'-фрагменты, Fd-фрагменты, и выделенных CDR или их наборов; одноцепочечных Fv; слияний полипептид-Fc; однодоменных антител (например, однодоменных антител акулы, таких как IgNAR или их фрагментов);

верблужьих антител; маскированных антител (например, Probody[®]); малых блочных иммунофармацевтических препаратов («SMIPTM»); одноцепочечных или tandemных диател (TandAb[®]); VHH; Anticalin[®]; минител Nanobody[®]; BiTE[®]; белков с анкириновым повтором или DARPIN[®]; Avimer[®]; DART; TCR-подобных антител; Adnectin[®]; Affilin[®]; Trans-body[®]; Affibody[®]; TrimerX[®]; MicroProtein; Fynommer[®], Centyrin[®] и KALBITOR[®]. Согласно некоторым вариантам осуществления у антитела может отсутствовать ковалентная модификация (например, присоединение гликана), которую оно имело бы, если бы вырабатывалось естественным путем. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело может содержать ковалентную модификацию (например, присоединение гликана, полезный груз [например, выявляемый фрагмент, терапевтический фрагмент, каталитический фрагмент и т. д.] или другую боковую группу [например, полиэтиленгликоль и т. д.]). Согласно многим вариантам осуществления средство на основе антитела представляет собой или содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого содержит один или более структурных элементов, известных специалистам в данной области, таких как определяющая комплементарность область (CDR); согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела представляет собой или содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого содержит по меньшей мере одну CDR (например, по меньшей мере одну CDR тяжелой цепи и/или по меньшей мере одну CDR легкой цепи), которая практически идентична таковой, встречающейся в эталонном антителе. Согласно некоторым вариантам осуществления включенная CDR практически идентична эталонной CDR, в том смысле, что она либо идентична по последовательности, либо содержит от 1 до 5 аминокислотных замен по сравнению с эталонной CDR. Согласно некоторым вариантам осуществления включенная CDR практически идентична эталонной CDR, в том смысле, что она демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с эталонной CDR. Согласно некоторым вариантам осуществления включенная CDR практически идентична эталонной CDR, в том смысле, что она демонстрирует по меньшей мере 96%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с эталонной CDR. Согласно некоторым вариантам осуществления включенная CDR практически идентична эталонной CDR, в том смысле, что по меньшей мере одна аминокислота в пределах

включенной CDR подвергнута делеции, добавлена или заменена по сравнению с эталонной CDR, но включенная CDR имеет аминокислотную последовательность, которая в остальном идентична таковой у эталонной CDR. Согласно некоторым вариантам осуществления включенная CDR практически идентична эталонной CDR, в том смысле, что 1-5 аминокислот в пределах включенной CDR подвергнуты делеции, добавлены или заменены по сравнению с эталонной CDR, но включенная CDR имеет аминокислотную последовательность, которая в остальном идентична эталонной CDR. Согласно некоторым вариантам осуществления включенная CDR практически идентична эталонной CDR, в том смысле, что по меньшей мере одна аминокислота в пределах включенной CDR заменена по сравнению с эталонной CDR, но включенная CDR имеет аминокислотную последовательность, которая в остальном идентична таковой у эталонной CDR. Согласно некоторым вариантам осуществления включенная CDR практически идентична эталонной CDR, в том смысле, что 1-5 аминокислот в пределах включенной CDR подвергнуты делеции, добавлены или заменены по сравнению с эталонной CDR, но включенная CDR имеет аминокислотную последовательность, которая в остальном идентична эталонной CDR. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела представляет собой или содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого содержит структурные элементы, известные специалистам в данной области как переменный домен иммуноглобулина. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела представляет собой полипептидный белок со связывающим доменом, который гомологичен или в значительной степени гомологичен связывающему домену иммуноглобулина.

[27] Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 содержит полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина и/или полипептид легкой цепи иммуноглобулина. Как обсуждалось выше, белок-1 запрограммированной смерти (PD-1) (также известный как белок-1 запрограммированной смерти клеток) представляет собой трансмембранный белок I типа из 268 аминокислот (Ishida et al, выше). PD-1 является представителем семейства CD28/CTLA-4 T-клеточных регуляторов и экспрессируется на активированных T-клетках, B-клетках и клетках миелоидной линии дифференцировки (Greenwald et al., *выше*; и Sharpe et al., *выше*). PD-1 содержит внеклеточный домен IgV, за которым

следуют короткий внеклеточный стебель, трансмембранная область и внутриклеточный хвост. Внутриклеточный хвост содержит два сайта фосфорилирования, расположенных в иммунорецепторном ингибиторном мотиве на основе тирозина и иммунорецепторном мотиве переключения на основе тирозина, которые определяют способность PD-1 негативно регулировать передачу сигналов от Т-клеточных рецепторов (см., например, Ishida et al., *выше*; и Blank et al., *выше*).

[28] Некоторые другие антитела, которые связываются с PD-1, и их компоненты, известны из уровня техники (см., например, патент США № 8168757; Toralian et al, *выше*; и Patnaik et al, *выше*). Некоторые антитела к PD-1 также коммерчески доступны из таких источников, как, например, Abcam (Кембридж, Массачусетс).

[29] Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренное средство на основе тяжелой цепи, легкой цепи и/или антитела гликозилировано по одному или более сайтам. Используемый в данном документе «гликан» означает компонент гликопротеина в виде сахарного полимера (фрагмента). Термин «гликан» охватывает свободные гликаны, включая гликаны, которые были отщеплены или иным образом высвобождены из гликопротеина. Согласно некоторым вариантам осуществления гликан связан с Fc-областью через атом N. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела гликозилировано по Asn297 (нумерация по Kabat).

[30] Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая одну или более гликоформ средства на основе тяжелой цепи, легкой цепи и/или антитела, описываемого в данном документе. Используемый в данном документе термин «гликоформа» относится к конкретной форме гликопротеина. То есть, если гликопротеин содержит конкретный полипептид, который потенциально может связываться с различными гликанами или наборами гликанов, то каждая отдельная версия гликопротеина (т. е. когда полипептид связан с конкретным гликаном или набором гликанов) обозначается как «гликоформа». Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренная композиция содержит несколько гликоформ одного или более средств на основе тяжелой цепи, легкой цепи и/или антитела, описываемых в данном документе. Согласно некоторым

вариантам осуществления предусмотренная композиция содержит несколько таких гликоформ, присутствующих в указанных абсолютных и/или относительных количествах. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрены композиции, которые могут практически не содержать одну или более конкретных гликоформ средства на основе тяжелой цепи, легкой цепи и/или антитела, описываемого в данном документе.

[31] Согласно некоторым вариантам осуществления количество гликоформы выражается как «процент». В случае любого заданного параметра «процент» относится к числу молей конкретного гликана (гликана X) относительно общего числа молей гликанов в препарате. Согласно некоторым вариантам осуществления «процент» относится к числу молей гликана X, высвобожденного из Fc под действием PNGазы F, относительно суммарного числа молей выявленных гликанов, высвобожденных из Fc под действием PNGазы F.

[32] Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренное средство на основе тяжелой цепи, легкой цепи и/или антитела имеет структуру, которая содержит одну или более дисульфидных связей. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или более дисульфидных связей находятся в ожидаемом положении иммуноглобулина IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления дисульфидная связь присутствует на одном или более остатках, соответствующих положениям, выбранным из остатка 22, 96, 130, 143, 199, 222, 225, 257, 317, 363 и 421 из SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления дисульфидная связь присутствует на одном или более остатках, соответствующих положениям, выбранным из остатка 23, 88, 134, 194 и 214 из SEQ ID NO: 2.

[33] Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична (например, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или 100% идентична) SEQ ID NO: 1 или 5.

[34] Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая

на по меньшей мере 90% идентична (например, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или 100% идентична) SEQ ID NO: 2 или 6.

[35] «Идентичность» последовательностей нуклеиновой кислоты или аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем документе, может быть определена путем сравнения представляющей интерес последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности с эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательностью. Процент идентичности представляет собой число нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми (т. е. которые являются идентичными) у представляющей интерес последовательности и эталонной последовательности, деленное на длину наиболее длинной последовательности (т. е. на длину либо представляющей интерес последовательности, либо эталонной последовательности, в зависимости от того, какая является более длинной). Известен целый ряд математических алгоритмов для получения оптимального выравнивания и вычисления идентичности между двумя или более последовательностями, и они внедрены в общедоступные компьютерные программы. Примеры таких программ включают CLUSTAL-W, T-Coffee и ALIGN (для выравнивания последовательностей нуклеиновой кислоты и аминокислотных последовательностей), программы BLAST (например, BLAST 2.1, BL2SEQ и их более поздние версии) и программы FASTA (например, FASTA3x, FASTM и SSEARCH) (для выравнивания последовательностей и поиска сходства последовательностей). Алгоритмы выравнивания последовательностей также описаны, например, в Altschul et al, *J. Molecular Biol*, 215(3): 403–410 (1990), Beigert et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(10): 3770–3775 (2009), Durbin et al, eds., *Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press, Cambridge, UK (2009), Soding, *Bioinformatics*, 21(1): 951–960 (2005), Altschul et al, *Nucleic Acids Res.*, 25(11): 3389–3402 (1997), и Gusfield, *Algorithms on Strings, Trees and Sequences*, Cambridge University Press, Cambridge UK (1997)).

[36] Одна или более аминокислот вышеупомянутых полипептидов тяжелой цепи и/или легкой цепи иммуноглобулина могут быть замещены или заменены другой

аминокислотой. «Замещение» или «замена» аминокислот означает замещение одной аминокислоты в заданном положении или остатке другой аминокислотой в том же положении или остатке последовательности полипептида.

[37] В широком смысле аминокислоты делятся на «ароматические» или «алифатические». Ароматическая аминокислота содержит ароматическое кольцо. Примеры «ароматических» аминокислот включают гистидин (H или His), фенилаланин (F или Phe), тирозин (Y или Tyr) и триптофан (W или Trp). В широком смысле неароматические аминокислоты принадлежат к группе «алифатических». Примеры «алифатических» аминокислот включают глицин (G или Gly), аланин (A или Ala), валин (V или Val), лейцин (L или Leu), изолейцин (I или Ile), метионин (M или Met), серин (S или Ser), треонин (T или Thr), цистеин (C или Cys), пролин (P или Pro), глутаминовую кислоту (E или Glu), аспарагиновую кислоту (D или Asp), аспарагин (N или Asn), глутамин (Q или Gln), лизин (K или Lys) и аргинин (R или Arg).

[38] Алифатические аминокислоты можно подразделить на четыре подгруппы. «Подгруппа неполярных больших алифатических аминокислот» состоит из валина, лейцина и изолейцина. «Подгруппа слабополярных алифатических аминокислот» состоит из метионина, серина, треонина и цистеина. «Подгруппа полярных/заряженных алифатических аминокислот» состоит из глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, аспарагина, глутамина, лизина и аргинина. «Подгруппа аминокислот с небольшими остатками» состоит из глицина и аланина. Группу заряженных/полярных аминокислот можно подразделить на три подгруппы: «подгруппу положительно заряженных аминокислот», состоящую из лизина и аргинина, «подгруппу отрицательно заряженных аминокислот», состоящую из глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, и «подгруппу полярных аминокислот», состоящую из аспарагина и глутамина.

[39] Ароматические аминокислоты можно подразделить на две подгруппы: «подгруппу аминокислот с азотсодержащим кольцом», состоящую из гистидина и триптофана, и «подгруппу аминокислот с фенильным кольцом», состоящую из фенилаланина и тирозина.

[40] Замещение или замена аминокислот могут быть консервативными, полуконсервативными или неконсервативными. Фраза «консервативная

аминокислотная замена» или «консервативная мутация» относится к замещению одной аминокислоты другой аминокислотой с общими свойствами. Функциональным способом определения общих свойств индивидуальных аминокислот является анализ нормализованных частот изменений аминокислот в соответствующих белках гомологичных организмов (Schulz and Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York (1979)). На основании таких анализов можно определять группы аминокислот, где аминокислоты в пределах группы преимущественно заменяются друг другом, а поэтому они наибольшим образом похожи друг на друга с точки зрения влияния на общую структуру белка (Schulz and Schirmer, выше).

[41] Примеры консервативных аминокислотных замен включают замены аминокислот в пределах вышеописанных подгрупп, например, лизином аргинина и наоборот, вследствие чего может сохраняться положительный заряд; глутаминовой кислотой аспарагиновую кислоту и наоборот, вследствие чего может сохраняться отрицательный заряд; серином треонина, вследствие чего может сохраняться свободный -ОН, и глутамином аспарагина, вследствие чего может сохраняться свободный -NH₂.

[42] «Полуконсервативные мутации» включают аминокислотные замены из аминокислот в пределах одних и те же групп, перечисленных выше, но не в пределах одной и той же подгруппы. Например, замена аспарагиновой кислотой аспарагина или аспарагином лизина, предусматривает аминокислоты в пределах в одной и той же группы, но различных подгрупп. «Неконсервативные мутации» предусматривают замены аминокислот, входящих в различные группы, например, лизином триптофана или фенилаланином серина и т. д.

[43] В настоящем изобретении предусмотрено, по меньшей мере частично, выделенное средство на основе антитела к PD-1, содержащее выделенные аминокислотные последовательности по настоящему изобретению, описываемые в данном документе, состоящее фактически из них или состоящее из них. Используемый в данном документе термин «выделенный» (или «очищенный») относится к последовательности нуклеиновой кислоты (например, полинуклеотиду) или аминокислотной последовательности (например, полипептиду), которая удалена или отделена от других компонентов, присутствующих в ее естественном окружении.

Например, выделенный полипептид представляет собой полипептид, который отделен от остальных компонентов клетки, в которой он вырабатывался (например, эндоплазматического ретикулула или цитоплазматических белков и РНК). Выделенный полинуклеотид представляет собой полинуклеотид, который отделен от остальных компонентов ядра (например, гистонов) и/или от последовательностей нуклеиновой кислоты, расположенных в направлении против хода транскрипции или по ходу транскрипции. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность может быть на по меньшей мере 60%, или на по меньшей мере 75%, или на по меньшей мере 90%, или на по меньшей мере 95%, или на по меньшей мере 98%, или на по меньшей мере 99% очищена от остальных компонентов, присутствующих в естественном окружении указанной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности.

[44] «Связывающее белок-1 запрограммированной смерти (PD-1) средство» означает молекулу, предпочтительно белковую молекулу, которая специфически связывается с белком-1 запрограммированной смерти (PD-1). Согласно некоторым вариантам осуществления связывающее PD-1 средство представляет собой средство на основе антитела к PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенное средство на основе антитела к PD-1 содержит полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина (например, SEQ ID NO:1) и/или полипептид легкой цепи иммуноглобулина (например, SEQ ID NO:2), состоит фактически из них или состоит из них. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенное средство на основе антитела к PD-1 содержит полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина, последовательность которого содержит SEQ ID NO:1, и полипептид легкой цепи иммуноглобулина, последовательность которого содержит SEQ ID NO:2, состоит фактически из них или состоит из них.

[45] Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный полипептид или полипептид тяжелой цепи состоит фактически из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5 и, кроме того, может содержать дополнительные компоненты, которые не воздействуют существенно на полипептид, например, воздействуя на аффинность полипептида тяжелой цепи по настоящему изобретению в отношении PD-1. Примеры таких компонентов включают, например, белковые фрагменты, такие как биотин, который облегчает очистку или

выделение, мутации-пассажиры, последовательности, не содержащие проблемных сайтов, включая свободные цистеины, дополнительные сайты гликозилирования и сайты с высокой вероятностью дезамидирования или изомеризации.

[46] Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный полипептид или полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5 и не содержит никаких дополнительных компонентов (т. е. компонентов, которые не являются эндогенными по отношению к полипептиду тяжелой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению).

[47] Согласно некоторым вариантам осуществления средства на основе антитела к PD-1 предусматривают варианты, в которых одна или более аминокислот в полипептиде тяжелой цепи иммуноглобулина и/или полипептиде легкой цепи иммуноглобулина замещены другим аминокислотным остатком или могут быть подвергнуты делеции или вставке в любой комбинации, при условии, что биологическая активность существенно не снижается (например, усиливается или улучшается) в результате аминокислотных замен, вставок и/или делеций. «Биологическая активность» средства на основе антитела к PD-1 относится, например, к аффинности связывания PD-1 или конкретного эпитопа PD-1, нейтрализации или ингибирования связывания белка PD-1 с его лигандами PD-L1 и PD-L2, нейтрализации или ингибирования активности белка PD-1 *in vivo* (например, IC₅₀), фармакокинетическим показателям и перекрестной реактивности (например, с не являющимися человеческими гомологами или ортологами белка PD-1, или с другими белками или тканями). Другие биологические свойства или характеристики антигенсвязывающего средства, признаваемые в уровне техники, например, включают avidность, селективность, растворимость, сворачивание, иммунотоксичность, экспрессию и возможность приготовления состава. Вышеупомянутые свойства или характеристики можно наблюдать, измерять и/или оценивать с использованием стандартных методик, в том числе без ограничения ELISA, конкурентный ELISA, анализ поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore™) или анализ кинетического исключения (KINEXA™), *in vitro* или *in vivo* анализы нейтрализации, анализы связывания рецептора с лигандом, анализы продуцирования и/или секреции цитокина или фактора роста и анализы трансдукции сигнала и иммуногистохимии.

[48] Термины «ингибировать» или «нейтрализовать», используемые в данном документе в отношении активности средства на основе антитела к PD-1, относятся к способности в значительной степени противодействовать, препятствовать, предупреждать, ограничивать, замедлять, нарушать, менять, исключать, останавливать или обращать, например, биологическую активность белка PD-1 или прогрессирование или тяжесть заболевания или состояния, связанного с белком PD-1. Согласно определенному варианту осуществления выделенное связывающее PD-1 средство ингибирует или нейтрализует активность белка PD-1 на по меньшей мере приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98%, приблизительно 99%, приблизительно 100% или на значение в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений (например, 20% - 100%, 40% - 100% или 60% - 95% и т. д.).

[49] Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 представляет собой полноразмерное антитело или его фрагмент (например, фрагмент антитела). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент антитела содержат константную область тяжелой цепи, которая основана на антителах IgG1, IgG2 или IgG4 дикого типа или их вариантах. Следует принимать во внимание, что каждый класс или изотип антител принимает участие в определенном наборе эффекторных механизмов для удаления или нейтрализации антигена после его распознавания. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления, если средство на основе антитела к PD-1 представляет собой антитело, то оно может проявлять одну или более эффекторных функций, таких как участие в антитело-зависимом комплемент-опосредованном лизисе или антитело-зависимой клеточной токсичности путем взаимодействий с эффекторными молекулами и клетками (например, активацию системы комплемента).

[50] Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 содержит одну или более мутаций в пределах области тяжелой цепи IgG. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 содержит константную

область тяжелой цепи IgG4 с одну или более мутациями в константной области тяжелой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи IgG4 с одной или более мутациями в шарнирной области. Предполагается, что согласно некоторым вариантам осуществления мутация в шарнирной области IgG4 может предотвращать обмен половиной молекулы с другими молекулами IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или более мутаций в шарнирной области IgG4 могут предусматривать мутацию S228P или стабилизирующую мутацию серина в пролин, которая предотвращает обмен половиной молекулы с другими молекулами IgG4. См., например, J. Biol. Chem. 2015; 290(9):5462–5469.

[51] Средство на основе антитела к PD-1 также может представлять собой конъюгат антитела. В данном аспекте средство на основе антитела к PD-1 может представлять собой конъюгат (1) антитела к PD-1 и (2) белкового или небелкового фрагмента. Например, средство на основе антитела к PD-1 может представлять собой антитело к PD-1, конъюгированное с пептидом, флуоресцентной молекулой или химиотерапевтическим средством.

[52] Средство на основе антитела к PD-1 может представлять собой человеческое антитело, не являющееся человеческим антителом или химерное антитело или может быть получено из них. «Химерное» означает антитело или его фрагмент, содержащие не только человеческие области, но и не являющиеся человеческими области. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 представляет собой гуманизированное антитело. «Гуманизированное» антитело представляет собой моноклональное антитело, содержащее остов человеческого антитела и по меньшей мере одну CDR, полученную или происходящую от не являющегося человеческого антитела. Не являющиеся человеческими антитела предусматривают антитела, выделенные из любого животного, не являющегося человеком, такого как, например, грызун (например, мыши или крысы). Гуманизированное антитело может содержать одну, две или три CDR, полученные или происходящие от не являющегося человеческого антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления CDRH3 средства на основе антитела к PD-1 получена из мышинового моноклонального антитела или происходит от него, тогда как остальные

вариабельные области и константная область средства на основе антитела получены из человеческого моноклонального антитела или происходят от него.

[53] Человеческое антитело, не являющееся человеческим антителом, химерное антитело или гуманизированное антитело могут быть получены с помощью любых средств, в том числе из *in vitro* источников (например, гибридомы или линии клеток, вырабатывающей рекомбинантное антитело) и *in vivo* источников (например, грызунов). Способы создания антител известны из уровня техники и описаны, например, в Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5: 511–519 (1976); Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988); и Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)). Согласно некоторым вариантам осуществления человеческое антитело или химерное антитело могут быть созданы с применением трансгенного животного (например, мыши), где один или более эндогенных генов иммуноглобулина замещены одним или более человеческими генами иммуноглобулина. Примеры трансгенных мышей, у которых эндогенные гены антител эффективно заменены человеческими генами антител, включают в себя без ограничения Medarex HUMAB-MOUSE™, Kirin TC MOUSE™ и Kyowa Kirin KM-MOUSE™ (см., например, Lonberg, *Nat. Biotechnol.*, 23(9): 1117–25 (2005), и Lonberg, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 181: 69–97 (2008)). Гуманизированное антитело может быть создано с применением любого подходящего способа, известного из уровня техники (см., например, An, Z. (ed.), *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (2009)), включая, например, прививание не являющихся человеческими CDR на каркас человеческого антитела (см., например, Kashmiri et al., *Methods*, 36(1): 25–34 (2005); и Hou et al., *J. Biochem.*, 144(1): 115–120 (2008)). Согласно некоторым вариантам осуществления гуманизированное антитело может быть получено с применением способов, описанных, например, в публикации заявки на патент США № 2011/0287485 A1.

[54] Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 связывает эпитоп PD-1, что блокирует связывание PD-1 с любым одним или более из его предполагаемых лигандов. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 связывает эпитоп PD-1, что блокирует связывание PD-1 с двумя или более из его предполагаемых лигандов. Согласно предпочтительному варианту осуществления средство на основе антитела к

PD-1 связывает эпитоп белка PD-1, что блокирует связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2.

[55] В настоящем изобретении также предусмотрены одна или более выделенных или очищенных последовательностей нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, полипептид легкой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению и/или средство на основе антитела к PD-1 по настоящему изобретению.

[56] Подразумевается, что термин «последовательность нуклеиновой кислоты» охватывает полимер ДНК или РНК, т. е. полинуклеотид, который может быть однонитевым или двухнитевым, и который может содержать неприродные или измененные нуклеотиды. Используемые в данном документе термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» относятся к полимерной форме нуклеотидов, имеющей любую длину и содержащей либо рибонуклеотиды (РНК), либо дезоксирибонуклеотиды (ДНК). Эти термины относятся к первичной структуре молекулы и, таким образом, предусматривают двухнитевую и однонитевую ДНК, а также двухнитевую и однонитевую РНК. Эти термины предусматривают в качестве эквивалентов аналоги РНК или ДНК, полученные из аналогов нуклеотидов, и модифицированные полинуклеотиды, такие как без ограничения метилированные и/или кэпированные полинуклеотиды. Нуклеиновые кислоты обычно связаны фосфатными связями с образованием последовательностей нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов, хотя из уровня техники известно множество других связей (например, фосфотиоаты, боранофосфаты и т. п.). Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды тяжелой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, содержат, например, SEQ ID NO: 3. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды легкой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, содержат, например, SEQ ID NO: 4.

[57] В настоящем изобретении также предусмотрен вектор, содержащий одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих связывающий PD-1 полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина, связывающий PD-1 полипептид легкой цепи иммуноглобулина и/или средство на основе антитела к PD-1. Вектором может быть, например, плазида, эписома, космида, вирусный вектор (например,

ретровирусный или аденовирусный) или фаг. Подходящие векторы и способы их получения хорошо известны в уровне техники (см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 3rd edition*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994)).

[58] Помимо последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид по настоящему изобретению, полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, полипептид легкой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению и/или средство на основе антитела к PD-1 по настоящему изобретению, вектор может содержать последовательности регуляции экспрессии, такие как промоторы, энхансеры, сигналы полиаденилирования, терминаторы транскрипции, сигнальные пептиды (например, сигнальный пептид остеонектина), сайты внутренней посадки рибосомы (IRES) и т. п., которые обеспечивают экспрессию кодирующей последовательности в клетке-хозяине. Типичные последовательности регуляции экспрессии известны в уровне техники и описаны, например, в Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).

[59] Из уровня техники хорошо известно большое число промоторов, включая конститутивные, индуцибельные и репрессируемые промоторы, происходящие из целого ряда различных источников. Типичные источники промоторов включают, например, гены вирусов, млекопитающих, насекомых, растений, дрожжей и бактерий, и подходящие промоторы из этих источников легкодоступны или могут быть получены синтетическим путем на основании общедоступных последовательностей, доступных, например, в депозитариях, таких как ATCC, а также из других коммерческих или индивидуальных источников. Промоторы могут быть однонаправленными (т. е. инициируют транскрипцию в одном направлении) или двунаправленными (т. е. инициируют транскрипцию в 3'- или 5'-направлении). Неограничивающие примеры промоторов включают, например, бактериальную систему экспрессии T7, бактериальную систему экспрессии pBAD (agaA), промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV. Индуцибельные промоторы включают, например, систему Tet (патенты США №№ 5464758 и 5814618), индуцибельную систему экдизона (No et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 3346–3351 (1996)), систему T-REX™ (Invitrogen,

Карлсбад, Калифорния), систему LACSWITCH™ (Stratagene, Сан-Диего, Калифорния) и индуцибельную систему тамоксифен-рекомбиназы Cre-ERT (Indra et al., *Nuc. Acid. Res.*, 27: 4324–4327 (1999); *Nuc. Acid. Res.*, 28: e99 (2000); патент США № 7112715; и Kramer & Fussenegger, *Methods Mol. Biol.*, 308: 123–144 (2005)).

[60] Используемый в данном документе термин «энхансер» относится к последовательности ДНК, которая усиливает транскрипцию, например, последовательности нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана.

[61] Энхансеры могут быть расположены на расстоянии нескольких тысяч пар оснований от кодирующей области последовательности нуклеиновой кислоты и могут опосредовать связывание регуляторных факторов, паттерны метилирования ДНК или изменения в структуре ДНК. Из уровня техники хорошо известно большое число энхансеров, происходящих из целого ряда различных источников, и они доступны в качестве клонированных полинуклеотидов или присутствуют внутри них (например, из депозитариев, таких как АТСС, а также в других коммерческих или индивидуальных источниках). Ряд полинуклеотидов, содержащих промоторы (такие как широко используемый промотор CMV), также содержат энхансерные последовательности. Энхансеры могут быть расположены в направлении против хода транскрипции кодирующих последовательностей, внутри этих последовательностей или в направлении по ходу транскрипции.

[62] Вектор также может содержать «селективный маркерный ген». Используемый в данном документе термин «селективный маркерный ген» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая обеспечивает возможность специфического позитивного или негативного отбора клеток, экспрессирующих последовательность нуклеиновой кислоты, по наличию соответствующего селективного средства. Подходящие селективные маркерные гены известны из уровня техники и описаны например, в публикациях международных заявок на патент WO 1992/008796 и WO 1994/028143; Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 3567–3570 (1980); O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 1527–1531 (1981); Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 2072–2076 (1981); Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150: 1–14 (1981); Santerre et al., *Gene*, 30: 147–156 (1984); Kent et al., *Science*, 237: 901–903 (1987); Wigler et al., *Cell*, 11: 223–232 (1977); Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA, 48: 2026–2034 (1962); Lowy et al, *Cell*, 22: 817–823 (1980); и в патентах США №№ 5122464 и 5770359.

[63] Согласно некоторым вариантам осуществления вектор представляет собой «эписомный вектор экспрессии» или «эписому», которые могут реплицироваться в клетке-хозяине и сохраняться внутри клетки-хозяина в виде внехромосомного сегмента ДНК при наличии соответствующего давления отбора (см., например, Conese et al., *Gene Therapy*, 11: 1735–1742 (2004)). Типичные коммерчески доступные эписомные векторы экспрессии включают без ограничения эписомные плазмиды, которые используют ядерный антиген-1 вируса Эпштейна-Барр (EBNA1) и точку начала репликации (*oriP*) вируса Эпштейна-Барр (EBV). Векторы pREP4, pCER4, pREP7 и pcDNA3.1 от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния) и pBK-CMV от Stratagene (Ла-Хойя, Калифорния) представляют неограничивающие примеры эписомного вектора, в котором вместо EBNA1 и *oriP* используются Т-антиген и точка начала репликации SV40.

[64] Другие подходящие векторы предусматривают интегрирующиеся векторы экспрессии, которые могут случайным образом интегрироваться в ДНК клетки-хозяина, или они могут содержать сайт рекомбинации, обеспечивающий специфическую рекомбинацию между вектором экспрессии и хромосомой клетки-хозяина. Такие интегрирующиеся векторы экспрессии могут использовать эндогенные последовательности регуляции экспрессии хромосом клеток-хозяев для осуществления экспрессии требуемого белка. Примеры векторов, которые интегрируются сайт-специфическим образом, включают, например, компоненты системы *flp-in* от Life Technologies (Карлсбад, Калифорния) (например, pcDNATM5/FRT) или системы *cre-lox*, которые могут встречаться в коровых векторах pExchange-6 от Stratagene (Ла-Хойя, Калифорния). Примеры векторов, которые случайным образом интегрируются в хромосомы клетки-хозяина, включают, например, pcDNA3.1 (при введении в отсутствие Т-антигена) от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния), UCOE от Millipore (Биллерика, Массачусетс) и pCI или pFN10A (ACT) FLEXITM от Promega (Мэдисон, Висконсин).

[65] Также могут применяться вирусные векторы. Типичные коммерчески доступные вирусные векторы экспрессии предусматривают без ограничения систему

на основе аденовируса Рег.С6 от Crucell, Inc. (Лейден, Нидерланды), систему на основе лентивируса рLP1 от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния) и ретровирусные векторы рFB-ERV и рCFB-EGSH от Stratagene (Ла-Хойя, Калифорния).

[66] Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотные последовательности по настоящему изобретению, могут вводиться в клетку на одном и том же векторе (т. е. в цис-положении). Однонаправленный промотор может применяться для регуляции экспрессии каждой последовательности нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления для регуляции экспрессии нескольких последовательностей нуклеиновой кислоты может применяться комбинация двунаправленных и однонаправленных промоторов. В качестве альтернативы, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотные последовательности по настоящему изобретению, могут вводиться в популяцию клеток на отдельных векторах (т. е. в транс-положении). Каждая из последовательностей нуклеиновой кислоты в каждом из отдельных векторов может содержать одинаковые или различные последовательности регуляции экспрессии. Отдельные векторы могут вводиться в клетки одновременно или последовательно.

[67] Вектор(ы), содержащий нуклеиновую кислоту(ы), кодирующую аминокислотные последовательности по настоящему изобретению, может быть введен в клетку-хозяина, способную экспрессировать кодируемые этими нуклеиновыми кислотами полипептиды, включая любую подходящую прокариотическую или эукариотическую клетку. В связи с этим в настоящем изобретении предусмотрена выделенная клетка, содержащая вектор по настоящему изобретению. Клетки-хозяева представляют собой клетки, которые можно легко и надежно выращивать, которые характеризуются высокой скоростью роста, имеют хорошо охарактеризованные системы экспрессии и могут легко и эффективно подвергаться трансформации или трансфекции.

[68] Примеры подходящих прокариотических клеток включают без ограничения клетки из рода *Bacillus* (такие как *Bacillus subtilis* и *Bacillus brevis*), *Escherichia* (такие как *E. coli*), *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Salmonella* и *Erwinia*. Применимые прокариотические клетки предусматривают, например, различные

штаммы *Escherichia coli* (например, K12, HB101 (№ в ATCC 33694), DH5 α , DH10, MC1061 (№ в ATCC 53338) и CC102).

[69] Согласно некоторым вариантам осуществления вектор по настоящему изобретению вводится в эукариотическую клетку. Подходящие эукариотические клетки известны из уровня техники и предусматривают, например, клетки дрожжей, клетки насекомых и клетки млекопитающих. Примеры подходящих клеток дрожжей включают клетки из рода *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhinosporidium*, *Saccharomyces* и *Schizosaccharomyces*. Клетки дрожжей предусматривают, например, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

[70] Подходящие клетки насекомых описаны, например, в Kitts et al., *Biotechniques*, 14: 810–817 (1993); Lucklow, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 4: 564–572 (1993); и Lucklow et al., *J. Virol.*, 67: 4566–4579 (1993). Клетки насекомых предусматривают, например, Sf-9 и HI5 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния).

[71] Согласно некоторым вариантам осуществления используются клетки млекопитающих. Из уровня техники известен ряд подходящих клеток-хозяев, представляющих собой клетки млекопитающих, и многие из них доступны из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Виргиния). Примеры подходящих клеток млекопитающих включают без ограничения клетки яичника китайского хомячка (CHO) (№ в ATCC CCL61), клетки CHO DHFR (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 4216–4220 (1980)), клетки эмбриональной почки человека (НЕК) 293 или клетки 293Т (№ в ATCC CRL1573) и клетки 3Т3 (№ в ATCC CCL92). Другими подходящими линиями клеток млекопитающих являются линии клеток обезьяны COS-1 (№ в ATCC CRL1650) и линии клеток COS-7 (№ в ATCC CRL1651), а также линия клеток CV-1 (№ в ATCC CCL70).

[72] Дополнительные иллюстративные клетки-хозяева, представляющие собой клетки млекопитающих, включают линии клеток приматов и линии клеток грызунов, в том числе линии трансформированных клеток. Подходящими являются также нормальные диплоидные клетки, штаммы клеток, происходящие от *in vitro* культуры первичной ткани, а также первичные эксплантаты. Другие подходящие линии клеток млекопитающих включают без ограничения клетки нейробластомы мыши N2A, HeLa, клетки мыши L-929 и линии клеток хомячка ВНК или HaK, все из

которых доступны от ATCC. Способы отбора подходящих клеток-хозяев, представляющих собой клетки млекопитающих, и способы трансформации, культивирования, амплификации, скрининга и очистки клеток известны из уровня техники.

[73] Согласно некоторым вариантам осуществления клетка млекопитающего представляет собой клетку человека. Например, клеткой млекопитающего может быть линия лимфоидных клеток человека или линия клеток, происходящих от лимфоидных клеток, такая как линия клеток, происходящая от пре-B-лимфоцитов. Примеры линий лимфоидных клеток человека включают без ограничения клетки RAMOS (CRL-1596), Daudi (CCL-213), EB-3 (CCL-85), DT40 (CRL-2111), 18-81 (Jack et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 1581–1585 (1988)), клетки Raji (CCL-86), клетки PER.C6 (Crucell Holland B.V., Лейден, Нидерланды) и их производные.

[74] Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность по настоящему изобретению, может вводиться в клетку за счет «трансфекции», «трансформации» или «трансдукции». Используемые в данном документе «трансфекция», «трансформация» или «трансдукция» относятся к введению одного или более экзогенных полинуклеотидов в клетку-хозяина с применением физических или химических способов. Из уровня техники известно множество методик трансфекции, и они предусматривают, например, соосаждение ДНК и фосфата кальция (см., например, Murray E.J. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, Gene Transfer and Expression Protocols, Humana Press (1991)); DEAE-декстран; электропорацию; трансфекцию, опосредуемую катионными липосомами; бомбардировку микрочастицами с применением частиц вольфрама (Johnston, *Nature*, 346: 776–777 (1990)); и соосаждение ДНК и фосфата стронция (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031–2034 (1987)). Фаговые или вирусные векторы могут вводиться в клетки-хозяева после выращивания инфекционных частиц в подходящих упаковывающих клетках, многие из которых являются коммерчески доступными.

[75] В настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая эффективное количество полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, полипептида легкой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, средства на основе антитела к PD-1, последовательности нуклеиновой

кислоты, кодирующей любое из вышеупомянутого, или вектора, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция представляет собой фармацевтически приемлемую (например, физиологически приемлемую) композицию, которая содержит носитель, предпочтительно фармацевтически приемлемый (например, физиологически приемлемый) носитель, и аминокислотные последовательности, антигенсвязывающее средство или вектор по настоящему изобретению. В контексте настоящего изобретения может быть использован любой подходящий носитель, и такие носители хорошо известны из уровня техники. Выбор носителя частично будет определяться конкретным участком, в который может быть введена композиция, и конкретным способом введения композиции. Необязательно композиция может быть стерильной. Композиция может быть заморожена или лиофилизована для ее хранения и разводиться подходящим стерильным носителем перед применением. Композиции можно получать согласно стандартным методикам, описанными, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2001).

[76] В настоящем изобретении также предусмотрен способ лечения любого заболевания или нарушения, при котором экспрессия, неадекватная экспрессия (например, сверхэкспрессия) или повышенная активность белка PD-1 вызывает или вносит вклад в патологические эффекты этого заболевания, или снижение уровней или активности белка PD-1 обеспечивает терапевтический эффект у млекопитающих, таких как человек. В настоящем изобретении также предусмотрен способ лечения рака или инфекционного заболевания у млекопитающего. Млекопитающие включают, например, мышей, крыс, кроликов, собак, кошек, коров, лошадей, отличных от человека приматов и человека. Способ предусматривает введение вышеупомянутой композиции млекопитающему, имеющему рак или инфекционное заболевание, с лечением тем самым рака или инфекционного заболевания у млекопитающего. Как обсуждается в данном документе, PD-1 на аномальном уровне экспрессируется при различных типах рака (см., например, Brown et al, J. Immunol., 170: 1257–1266 (2003); и Flies et. al, Yale Journal of Biology and Medicine, 84: 409–421 (2011)), и экспрессия PD-L1 у некоторых пациентов с почечноклеточной карциномой коррелирует с агрессивностью опухоли.

[77] Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрены способы усиления иммунного ответа или повышения активности иммунной клетки у млекопитающего, имеющего нарушение, которое реагирует на ингибирование PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие способы предусматривают введение эффективного количества любого связывающего PD-1 средства или средства на основе антитела, описываемых в данном документе. Согласно некоторым вариантам осуществления введение связывающего PD-1 средства усиливает или повышает иммунную ответ или активность иммунных клеток у млекопитающего или в его ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления иммунный ответ представляет собой гуморальный или опосредованный клетками иммунный ответ. Согласно некоторым вариантам осуществления иммунный ответ представляет собой CD4 или CD8 T-клеточный ответ. Согласно некоторым вариантам осуществления иммунный ответ представляет собой B-клеточный ответ.

[78] Способы и композиции по настоящему изобретению, описываемые в данном документе, можно применять для лечения любого типа рака, известного из уровня техники, такого как, например, меланома, почечноклеточная карцинома, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак желчного пузыря, рак гортани, рак печени, рак щитовидной железы, рак желудка, рак слюнных желез, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, аденокарцинома (например, аденокарцинома легкого) или карцинома из клеток Меркеля (см., например, Bhatia et al., *Curr. Oncol. Rep.*, 13(6): 488–497 (2011)). Согласно некоторым вариантам осуществления рак представляет собой рак эндометрия, рак молочной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак фаллопиевых труб, рак яичка, первичный рак брюшины, рак толстой кишки, рак толстой и прямой кишки, рак желудка, рак тонкого кишечника, плоскоклеточную карциному аногенитальной области, меланому, почечноклеточную карциному, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточную карциному легкого, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак печени, рак щитовидной железы, рак гортани, рак слюнных желез, рак пищевода, рак головы и шеи, плоскоклеточную карциному головы и шеи, аденокарциному, аденокарциному легкого, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, мезотелиому, карциному из клеток Меркеля, саркому, глиобластоми или гематологический рак (например, множественную миелому, В-

клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина/первичную медиастинальную В-клеточную лимфому или хронический миелогенный лейкоз). Согласно некоторым вариантам осуществления рак, подлежащий лечению посредством способов и/или композиций по настоящему изобретению, описываемых в данном документе, характеризуется микросателлитной нестабильностью или ее отсутствием. Микросателлитная нестабильность («MSI») представляет собой или предусматривает изменение в ДНК определенных клеток (таких как опухолевые клетки), при котором число повторов микросателлитов (коротких повторяющихся последовательностей ДНК) отличается от числа повторов, которые содержались в ДНК, из которой она произошла. Микросателлитная нестабильность возникает вследствие неспособности исправить ошибки, связанные с репликацией, из-за дефектной системы репарации ошибочного спаривания (MMR) ДНК. Такая неспособность обеспечивает возможность сохранения мутаций ошибочного спаривания по всему геному, но особенно в областях повторяющейся ДНК, известных как микросателлиты, что приводит к увеличению мутационной нагрузки. Было продемонстрировано, что по меньшей мере некоторые опухоли, для которых характерна MSI-H, проявляют улучшенные ответы на определенные средства к PD-1 (Le et al., (2015) *N. Engl. J. Med.* 372(26):2509–2520; Westdorp et al., (2016) *Cancer Immunol. Immunother.* 65(10):1249–1259).

[79] Согласно некоторым вариантам осуществления статус микросателлитной нестабильности рака предусматривает высокую микросателлитную нестабильность (например, статус MSI-H). Согласно некоторым вариантам осуществления статус микросателлитной нестабильности рака предусматривает низкую микросателлитную нестабильность (например, статус MSI-L). Согласно некоторым вариантам осуществления статус микросателлитной нестабильности рака предусматривает стабильный по микросателлитам (например, статус MSS). Согласно некоторым вариантам осуществления статус микросателлитной нестабильности оценивают с помощью анализа на основе секвенирования нового поколения (NGS), анализа на основе иммуногистохимии (ИHC) и/или анализа на основе PCR. Согласно некоторым вариантам осуществления микросателлитную нестабильность выявляют с помощью NGS. Согласно некоторым вариантам осуществления микросателлитную

нестабильность выявляют с помощью ИНС. Согласно некоторым вариантам осуществления микросателлитную нестабильность выявляют с помощью PCR.

[80] Согласно вариантам осуществления рак ассоциирован с высокой мутационной нагрузкой опухоли (TMB). Согласно некоторым вариантам осуществления рак ассоциирован с высокой TMB и MSI-H. Согласно некоторым вариантам осуществления рак ассоциирован с высокой TMB и MSI-L или MSS. Согласно некоторым вариантам осуществления рак представляет собой рак эндометрия, ассоциированный с высокой TMB. Согласно некоторым родственным вариантам осуществления рак эндометрия ассоциирован с высокой TMB и MSI-H. Согласно некоторым родственным вариантам осуществления рак эндометрия ассоциирован с высокой TMB и MSI-L или MSS.

[81] Согласно некоторым вариантам осуществления рак представляет собой рак с недостаточной репарацией ошибочного спаривания. Микросателлитная нестабильность может возникать вследствие неспособности исправить ошибки, связанные с репликацией, из-за дефектной системы репарации ошибочного спаривания (MMR) ДНК. Такая неспособность обеспечивает возможность сохранения мутаций ошибочного спаривания по всему геному, но особенно в областях повторяющейся ДНК, известных как микросателлиты, что приводит к увеличению мутационной нагрузки, что может улучшить ответ на определенные средства к PD-1. Там же. Согласно некоторым вариантам осуществления рак представляет собой гипермутированный рак. Согласно некоторым вариантам осуществления рак несет мутацию в полимеразе эpsilon (POLE).

[82] Способы по настоящему изобретению можно применять для любого типа лечения инфекционного заболевания (т. е. заболевания или нарушения, вызываемого бактерией, вирусом, грибом или паразитом). Примеры инфекционных заболеваний, которые можно лечить посредством способа по настоящему изобретению, включают без ограничения заболевания, вызываемые вирусом иммунодефицита человека (HIV), респираторно-синцитиальным вирусом (RSV), вирусом гриппа, вирусом денге, вирусом гепатита В (HBV) или вирусом гепатита С (HCV).

[83] Способы по настоящему изобретению можно применять для лечения любого типа аутоиммунного заболевания (т. е. заболевания или нарушения,

вызываемого гиперактивностью иммунной системы, при которой организм атакует и повреждает свои собственные ткани), такого как заболевания, описанные, например, в MacKay I.R. and Rose N.R., eds., *The Autoimmune Diseases, Fifth Edition*, Academic Press, Waltham, MA (2014). Примеры аутоиммунных заболеваний, которые можно лечить посредством способа по настоящему изобретению, включают без ограничения рассеянный склероз, сахарный диабет 1 типа, ревматоидный артрит, склеродермию, болезнь Крона, псориаз, системную красную волчанку (SLE) и язвенный колит.

[84] Введение композиции, содержащей полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, полипептид легкой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, связывающее PD-1 средство по настоящему изобретению, последовательность нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, кодирующую любое из вышеупомянутого, или вектор по настоящему изобретению, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, индуцирует иммунный ответ против рака или инфекционного заболевания у млекопитающего. Млекопитающие включают, например, мышей, крыс, кроликов, собак, кошек, коров, лошадей, отличных от человека приматов и человека. «Иммунный ответ» может подразумевать, например, выработку антител и/или активацию иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток).

[85] Используемые в данном документе термины «лечение», «осуществление лечения» и т. п. относятся к достижению требуемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Согласно некоторым вариантам осуществления эффект представляет собой терапевтический эффект, т. е. эффектом является частичное или полное излечение заболевания и/или негативного симптома, присущего заболеванию. В связи с этим, способ по настоящему изобретению предусматривает введение «терапевтически эффективного количества» связывающего PD-1 средства. «Терапевтически эффективное количество» относится к количеству, которое при дозировках и в течение необходимых периодов времени эффективно в достижении требуемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст, пол и масса индивидуума, а также способность связывающего PD-1 средства вызывать требуемый ответ у индивидуума. Например, терапевтически эффективным количеством связывающего PD-1 средства является количество, снижающее

биоактивность белка PD-1 у человека и/или усиливающее иммунный ответ против рака или инфекционного заболевания.

[86] В качестве дополнения или альтернативы фармакологический и/или физиологический эффект может быть профилактическим, т. е. эффект полностью или частично предупреждает заболевание или его симптом. При этом способ по настоящему изобретению предусматривает введение «профилактически эффективного количества» средства на основе антитела к PD-1. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, которое при дозировках и в течение необходимых периодов времени эффективно в достижении требуемого профилактического результата (например, предупреждения начала развития заболевания).

[87] Типичная доза может находиться, например, в диапазоне от 1 пг/кг до 20 мг/кг массы тела животного или человека; однако дозы выше или ниже данного иллюстративного диапазона попадают в объем настоящего изобретения. Ежесуточная парентеральная доза может составлять от приблизительно 0,00001 мкг/кг до приблизительно 20 мг/кг общей массы тела (например, приблизительно 0,001 мкг/кг, приблизительно 0,1 мкг/кг, приблизительно 1 мкг/кг, приблизительно 5 мкг/кг, приблизительно 10 мкг/кг, приблизительно 100 мкг/кг, приблизительно 500 мкг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, или находится в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений). Согласно некоторым вариантам осуществления доза составляет от приблизительно 0,1 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг общей массы тела (например, приблизительно 0,5 мкг/кг, приблизительно 1 мкг/кг, приблизительно 50 мкг/кг, приблизительно 150 мкг/кг, приблизительно 300 мкг/кг, приблизительно 750 мкг/кг, приблизительно 1,5 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, или находится в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений). Согласно некоторым вариантам осуществления доза составляет от приблизительно 1 мкг/кг до 5 мг/кг общей массы тела (например, приблизительно 3 мкг/кг, приблизительно 15 мкг/кг, приблизительно 75 мкг/кг, приблизительно 300 мкг/кг, приблизительно 900 мкг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг, или находится в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений). Согласно некоторым вариантам осуществления доза составляет от приблизительно 0,5 до 15 мг/кг массы тела в сутки (например, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2,5 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг,

приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 9 мг/кг, приблизительно 11 мг/кг, приблизительно 13 мг/кг, или находится в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений). Терапевтическую или профилактическую эффективность можно отслеживать путем проведения периодической оценки получающих лечение пациентов. В случае повторных введений в течение нескольких суток или более в зависимости от состояния лечение можно повторять до проявления требуемого подавления симптомов заболевания. Однако могут быть применимы и другие схемы введения доз, и эти схемы попадают в объем настоящего изобретения. Требуемая дозировка может доставляться за счет однократного болюсного введения композиции, нескольких болюсных введений композиции или непрерывного инфузионного введения композиции.

[88] Композиция(и), содержащая эффективное количество полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, полипептида легкой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, связывающего PD-1 средства по настоящему изобретению, последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, кодирующей любое из вышеупомянутого, или вектор по настоящему изобретению, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, может вводиться млекопитающему с применением стандартных методик введения, включая пероральное, глазное, парентеральное, внутривенное, внутрибрюшинное, подкожное, легочное, бронхиальное, буккальное, интрадермальное, внутрикожное, трансдермальное, местное, внутримышечное, интраназальное, буккальное, подъязычное, энтеральное, внутриартериальное, внутрижелудочное, внутрь конкретного органа (например, внутрипеченочное), ректальное, подкожное, подъязычное, трахеальное, вагинальное, витреальное, интрамедуллярное, интратекальное, интравентрикулярное, чресслизистое введение или введение с помощью суппозитория. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция подходит для парентерального введения. Используемый в данном документе термин «парентеральное» предусматривает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. Согласно некоторым вариантам осуществления композицию вводят млекопитающему с применением периферической системной доставки за счет внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции. Млекопитающие включают, например,

мышей, крыс, кроликов, собак, кошек, коров, лошадей, отличных от человека приматов и человека.

[89] После введения млекопитающему (например, человеку) биологическую активность средства на основе антитела к PD-1 можно измерять любым подходящим способом, известным из уровня техники. Например, биологическую активность можно оценить посредством определения стабильности конкретного связывающего PD-1 средства. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 характеризуется *in vivo* временем полувыведения от приблизительно 30 минут до 45 суток (например, приблизительно 30 минут, приблизительно 45 минут, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 6 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 1 сутки, приблизительно 5 суток, приблизительно 10 суток, приблизительно 15 суток, приблизительно 25 суток, приблизительно 35 суток, приблизительно 40 суток, приблизительно 45 суток, или находится в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений). Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 характеризуется *in vivo* временем полувыведения от приблизительно 2 часов до 20 суток (например, приблизительно 5 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 15 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 2 суток, приблизительно 3 суток, приблизительно 7 суток, приблизительно 12 суток, приблизительно 14 суток, приблизительно 17 суток, приблизительно 19 суток, или находится в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений). Согласно некоторым вариантам осуществления связывающее PD-1 средство характеризуется *in vivo* временем полувыведения от приблизительно 10 суток до приблизительно 40 суток (например, приблизительно 10 суток, приблизительно 13 суток, приблизительно 16 суток, приблизительно 18 суток, приблизительно 20 суток, приблизительно 23 суток, приблизительно 26 суток, приблизительно 29 суток, приблизительно 30 суток, приблизительно 33 суток, приблизительно 37 суток, приблизительно 38 суток, приблизительно 39 суток, приблизительно 40 суток, или находится в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений).

[90] Стабильность средства на основе антитела к PD-1 можно измерить с применением любого другого подходящего анализа, известного из уровня техники,

такого как, например, измерение времени полувыведения из сыворотки, дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC), анализы на тепловой сдвиг и анализы вытеснения метки. Другие способы измерения стабильности белка *in vivo* и *in vitro*, которые можно применять в контексте настоящего изобретения, описаны, например, в *Protein Stability and Folding*, B.A. Shirley (ed.), Human Press, Totowa, New Jersey (1995); *Protein Structure, Stability, and Interactions (Methods in Molecular Biology)*, Shiver J.W. (ed.), Humana Press, New York, NY (2010); и Ignatova, *Microb. Cell Fact.*, 4: 23 (2005).

[91] Стабильность средства на основе антитела к PD-1 можно измерить по величине средней точки перехода (T_m), представляющей собой температуру, при которой 50% аминокислотной последовательности присутствует в своей нативной конформации, а остальные 50% денатурированы. В целом, чем выше T_m , тем более стабильным является белок. Согласно некоторым вариантам осуществления значение средней точки перехода (T_m) *in vitro* для связывающего PD-1 средства по настоящему изобретению составляет приблизительно 60-100°C. Например, $T_{min\ vitro}$ средства на основе антитела к PD-1 может составлять приблизительно 65-80°C (например, 66°C, 68°C, 70°C, 71°C, 75°C или 79°C), приблизительно 80-90°C (например, приблизительно 81°C, 85°C или 89°C) или приблизительно 90-100°C (например, приблизительно 91°C, приблизительно 95°C или приблизительно 99°C).

[92] Биологическую активность конкретного средства на основе антитела к PD-1 также можно оценить путем определения аффинности его связывания белком PD-1 или его эпитопом. Термин «аффинность» относится к константе равновесия для обратимого связывания двух средств и выражается как константа диссоциации (K_D). Аффинность связывания средства с лигандом, такая как аффинность связывания антитела с эпитопом, может быть, например, от приблизительно 1 пикомоль/л (пМ) до приблизительно 100 микромоляр/л (мкМ) (например, от приблизительно 1 пикомоль/л (пМ) до приблизительно 1 наномоль/л (нМ), от приблизительно 1 нМ до приблизительно 1 микромоляр/л (мкМ) или от приблизительно 1 мкМ до приблизительно 100 мкМ). Согласно некоторым вариантам осуществления связывающее PD-1 средство может связываться с белком PD-1 с K_D , равной 1 наномоль/л или меньше (например, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ, 0,025 нМ, 0,01 нМ, 0,001 нМ, или находится в

диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений). Согласно некоторым вариантам осуществления связывающее PD-1 средство может связываться с PD-1 с K_D , равной 200 пМ или меньше (например, 190 пМ, 175 пМ, 150 пМ, 125 пМ, 110 пМ, 100 пМ, 90 пМ, 80 пМ, 75 пМ, 60 пМ, 50 пМ, 40 пМ, 30 пМ, 25 пМ, 20 пМ, 15 пМ, 10 пМ, 5 пМ, 1 пМ, или находится в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений). Аффинность иммуноглобулина в отношении представляющего интерес антигена или эпитопа можно оценить с помощью любого принятого в данной области анализа. Такие способы предусматривают, например, сортировку клеток с активацией флуоресценции (FACS), отделяемые гранулы (например, магнитные гранулы), поверхностный плазмонный резонанс (SPR), конкурентное связывание в жидкой фазе (KINEXA™), пэннинг антигена и/или ELISA (см., например, Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5th ed., Garland Publishing, New York, NY, 2001).

[93] Средство на основе антитела к PD-1 можно вводить отдельно или в комбинации с другими лекарственными средствами (например, в качестве адьюванта). Например, связывающее PD-1 средство можно вводить в комбинации с другими средствами для лечения или предотвращения заболеваний, раскрываемых в данном документе, чтобы средства, которые являются цитотоксичными для раковых клеток, модулировали иммуногенность раковых клеток или стимулировали иммунные ответы на раковые клетки. При этом, например, средство на основе антитела к PD-1 можно применять в комбинации с по меньшей мере одним другим противораковым средством, включая, например, любое химиотерапевтическое средство, известное из уровня техники; ионизирующее излучение; низкомолекулярные противораковые средства; противораковые вакцины; биологические терапевтические средства (например, другие моноклональные антитела, противораковые вирусы, средства генной терапии и адоптивный перенос Т-клеток) и/или хирургическую операцию. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекта (например, млекопитающего, например, человека), подлежащего лечению средством на основе антитела к PD-1, лечили или будут лечить химиотерапией (например, химиотерапией на основе платины). Согласно некоторым вариантам осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой актиномицин, полностью транс-ретиноевую кислоту, азацитидин, азатиоприн, блеомицин, бортезомиб, карбоплатин, капецитабин, цисплатин, хлорамбуцил,

циклофосфамид, цитарабин, даунорубицин, доцетаксел, доксофлуридин, доксорубицин, эпирубицин, эпотилон, этопозид, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевину, идарубицин, иматиниб, иринотекан, мехлорэтамин, меркаптопурин, метотрексат, митоксантрон, оксалиплатин, паклитаксел, пеметрексед, тенипозид, тиогуанин, топотекан, валрубицин, вемурафениб, вибластин, винкристин, виндезин или винорелбин Согласно некоторым таким вариантам осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое средство на основе платины, такое как цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, недаплатин, триплатина тетранитрат, фенантриплатин, пикоплатин или сатраплатин. Согласно некоторым таким вариантам осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой фолатный антиметаболит, такой как пеметрексед. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекта (например, млекопитающего, например, человека), подлежащего лечению средством на основе антитела к PD-1, лечили или будут лечить антиангиогенным средством, например, бевацизумабом, итраконазолом, карбоксиамидотриазолом, TNP-470, фумагиллином, CM101, IL-12, тромбоцитарным фактором-4, сурамином, SU5416, тромбоспондином, ангиостатическими стероидами, гепарином, хрящевым фактором, ингибирующим ангиогенез (например, пептидом тропонин I и хондромодулин I), ингибитором матричной металлопротеиназы, ангиостатином, эндостатином, 2-метоксиэстрадиолом, текогаланом, тетрадиолибдатом, тромбоспондином, талидомидом, пролактином, ингибитором $\alpha V\beta 3$, леналидомидом, линомидом, рамуцирумабом, тасквинимодом, ранибизумабом, сорафенибом, сунитинибом, пазопанибом, эверолимусом, тканевыми ингибиторами металлопротеаз (TIMP1 и TIMP2), растворимым рецептором bFGF, трансформирующим фактором роста бета, интерфероном альфа, интерфероном бета, растворимыми рецепторами KDR и FLT-1, белком, родственным плацентарному пролиферину, пазопанибом, сунитинибом, сорафенибом, акситинибом, понатинибом, кабозантинибом, регорафенибом, вандетанибом, ленватинибом, семаксанибом, SU6668, ваталанибом, тивозанибом, цедиранибом, протамином, гепарином, стероидами, эфирами аскорбиновой кислоты, сульфатированным полисахаридом DS 4152, фумагиллином, AGM 12470, неовастатом, RO4929097, MRK-003, MK-0752, PF03084014, MEDI0639, куркумином, 3,3'-дииндолилметаном (DIM), ресвератролом, 3,5-бис(2,4-дифторбензилиден)-4-пиперидоном (DiFiD) и эпигаллокатехин-3-галлатом

(EGCG), хонокиолом, Flt2-11, CBO-P11, Je-11, V1 и любой их комбинацией. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 можно применять в комбинации с противовоспалительным средством, включая, например, кортикостероиды (например, преднизон и флутиказон) и нестероидные противовоспалительные средства (NSAID) (например, аспирин, ибупрофен и напроксен).

[94] Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 применяют для лечения инфекционного заболевания. Если способ по настоящему изобретению применяют для лечения инфекционного заболевания, то средство на основе антитела к PD-1 можно вводить в комбинации с по меньшей мере одним противобактериальным средством или по меньшей мере одним противовирусным средством. При этом противобактериальным средством может быть любой подходящий антибиотик, известный из уровня техники. Противовирусным средством может быть любая вакцина любого подходящего типа, которая специфически нацеливается на конкретный вирус (например, живые аттенуированные вакцины, субъединичные вакцины, рекомбинантные векторные вакцины) и низкомолекулярные противовирусные терапевтические средства (например, ингибиторы вирусной репликации и аналоги нуклеозидов).

[95] Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 применяют для лечения аутоиммунного заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой рассеянный склероз, сахарный диабет 1 типа, ревматоидный артрит, склеродермию, болезнь Крона, псориаз, системную красную волчанку (SLE) или язвенный колит. Если способ по настоящему изобретению применяют для лечения аутоиммунного заболевания, то средство на основе антитела к PD-1 можно применять в комбинации с противовоспалительным средством, включая, например, кортикостероиды (например, преднизон и флутиказон) и нестероидные противовоспалительные средства (NSAID) (например, аспирин, ибупрофен и напроксен).

[96] Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 может быть введено в комбинации с другими средствами, которые ингибируют пути контрольных точек иммунного ответа. Например, связывающее PD-

1 средство может быть введено в комбинации со средствами, которые ингибируют пути CTLA-4, TIM-3 или LAG-3 или противодействуют им. Было продемонстрировано, что виды комбинированной терапии, одновременно нацеливающиеся на два или более таких путей контрольных точек иммунного ответа, повышают противоопухолевую активность и потенциально действуют синергически с ней (см., например, Sakuishi et al., *J. Exp. Med.*, 207: 2187–2194 (2010); Ngiow et al., *Cancer Res.*, 71: 3540–3551 (2011); и Woo et al., *Cancer Res.*, 72: 917–927 (2012)). Согласно некоторым вариантам осуществления связывающее PD-1 средство по настоящему изобретению вводят в комбинации с антителом, которое связывается с TIM-3, и/или с антителом, которое связывается с LAG-3. При этом способ по настоящему изобретению, предназначенный для лечения рака или инфекционного заболевания у млекопитающего, может дополнительно предусматривать введение млекопитающему композиции, содержащей (i) антитело, которое связывается с белком TIM-3, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель, или композиции, содержащей (i) антитело, которое связывается с белком LAG-3, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель. Иллюстративные средства на основе антител, специфические в отношении LAG-3 и TIM-3, описаны в WO2016/126858 и WO2016/161270, соответственно, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 можно применять в комбинации с противовоспалительным средством, включая, например, кортикостероиды (например, преднизон и флутиказон) и нестероидные противовоспалительные средства (NSAID) (например, аспирин, ибупрофен и напроксен).

[97] Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 вводят в комбинации со средством, которое ингибирует передачу сигнала LAG-3, и/или со средством, которое ингибирует передачу сигнала TIM-3. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 вводят субъекту, которому ввели или будут вводить средство, которое ингибирует передачу сигнала LAG-3, вследствие чего субъект получает лечение обоими средствами. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 вводят субъекту, которому ввели или будут вводить средство, которое ингибирует передачу сигнала TIM-3, вследствие чего субъект получает лечение обоими средствами. Согласно некоторым вариантам осуществления млекопитающее,

которое получает лечение средством на основе антитела к PD-1, получало или будет получать лечение средством, которое ингибирует TIM-3, и средством, которое ингибирует LAG-3, вследствие чего млекопитающее получает все три средства. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к PD-1 вводят в комбинации с антителом, которое связывается с LAG-3, и/или антителом, которое связывается с TIM-3.

[98] Согласно некоторым вариантам осуществления субъект получает или будет получать один или более дополнительных видов терапии в комбинации со средством на основе антитела к PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство терапии представляет собой ингибитор PARP. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор PARP представляет собой ABT-767, AZD 2461, BGB-290, BGP 15, CEP 8983, CEP 9722, DR 2313, E7016, E7449, флузопариб (SHR 3162), IMP 4297, INO1001, JPI 289, JPI 547, конъюгат моноклональное антитело B3-LysPE40, MP 124, нирапариб (ZEJULA) (МК-4827), NU 1025, NU 1064, NU 1076, NU1085, олапариб (AZD2281), ONO2231, PD 128763, R 503, R554, рукапариб (RUBRACA) (AG-014699, PF-01367338), SBP 101, SC 101914, симмипариб, талазопариб (BMN-673), велипариб (ABT-888), WW 46, 2-(4-(трифторметил)фенил)-7,8-дигидро-5Н-тиопирано[4,3-d]пиримидин-4-ол и их соли или производные. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор PARP представляет собой нирапириб, олапариб, рукапариб, талазопариб и велипариб. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительные виды терапии предусматривают лечение композицией, которая доставляет средство, ингибирующее TIM-3 или LAG-3, и лечение ингибитором PARP, вследствие чего субъект получает лечение всеми тремя средствами. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительные виды терапии предусматривают лечение композицией, которая доставляет средство, ингибирующее TIM-3, лечение композицией, которая доставляет средство, ингибирующее LAG-3, и лечение ингибитором PARP, вследствие чего субъект получает лечение всеми четырьмя средствами.

[99] Кроме терапевтических путей применения средство на основе антитела к PD-1, описываемое в данном документе, может применяться в диагностике или исследованиях. При этом средство на основе антитела к PD-1 может применяться в способе диагностики рака или инфекционного заболевания. Аналогичным образом,

средство на основе антитела к PD-1 можно применять в анализе для отслеживания уровней белка PD-1 у субъекта, тестируемого на предмет заболевания или нарушения, которое ассоциировано с аномальной экспрессией PD-1. Исследовательские применения предусматривают, например, способы, в которых используется средство на основе антитела к PD-1 и метка для выявления белка PD-1 в образце, например, в физиологической жидкости человека или в экстракте клеток или тканей. Средство на основе антитела к PD-1 можно применять в немодифицированном или модифицированном виде, например, при ковалентном или нековалентном мечении выявляемым фрагментом. Например, выявляемым фрагментом может быть радиоизотоп (например, ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I), флуоресцентное или хемилюминесцентное соединение (например, флуоресцеин-изотиоцианат, родамин или люциферин), фермент (например, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или пероксидаза хрена) или простетические группы. В контексте настоящего изобретения может быть применен любой известный из уровня техники способ отдельного конъюгирования антигенсвязывающего средства (например, антитела) с выявляемым фрагментом (см., например, Hunter et al., *Nature*, 194: 495–496 (1962); David et al., *Biochemistry*, 13: 1014–1021 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.*, 40: 219–230 (1981); и Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407–412 (1982)).

[100] Уровни белка PD-1 могут быть измерены с применением средства на основе антитела к PD-1, описываемого в данном документе, с применением любого подходящего способа, известного из уровня техники. Такие способы предусматривают, например, радиоиммуноанализ (RIA) и FACS. Нормальные или стандартные значения экспрессии белка PD-1 можно получить с применением любой подходящей методики, например, путем объединения образца, содержащего или предположительно содержащего полипептид PD-1, и антитела, специфического к PD-1, в условиях, подходящих для образования комплекса антиген-антитело. Антитело прямо или опосредованно метят выявляемым веществом для облегчения выявления связавшегося или несвязавшегося антитела. Подходящие выявляемые вещества включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы и радиоактивные материалы (см., например, Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc. (1987)). Количество полипептида PD-1, экспрессируемого в образце, затем сравнивают со стандартным значением.

[101] Средство на основе антитела к PD-1 может обеспечиваться в наборе, т. е. упакованной комбинации реагентов в заранее предварительно количествах с инструкциями по осуществлению диагностического анализа. Если связывающее PD-1 средство помечено ферментом, то набор предпочтительно содержит субстраты и кофакторы, необходимые для фермента (например, субстратный предшественник, который приводит к выявляемому хромофору или флуорофору). Кроме того, в набор могут быть включены и другие добавки, такие как стабилизаторы, буферы (например, блокирующий буфер или буфер для лизиса) и т. п. Относительные количества различных реагентов могут варьироваться для обеспечения в растворе концентраций реагентов, которые значительно оптимизируют чувствительность анализа. Реагенты могут обеспечиваться в виде сухих порошков (обычно лиофилизированных), и наборы включают вспомогательные средства, которые после растворения будут обеспечивать раствор реагента, имеющий соответствующую концентрацию.

[102] Другие признаки настоящего изобретения станут очевидными на протяжении следующего описания иллюстративных вариантов осуществления, которые приведены в качестве иллюстрации настоящего изобретения и не предназначены для его ограничения.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. Описание определенных иллюстративных антител к PD-1

[103] В данном примере описаны конкретные последовательности полипептида тяжелой цепи и полипептида легкой цепи антитела к PD-1, а также нуклеиновые кислоты, кодирующие их.

Полипептид тяжелой цепи антитела к PD-1 (последовательности CDR) (SEQ ID NO:1)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSTISGGGS
YTTYQDSVKGRFRTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYYAMDYWGQGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Полипептид легкой цепи антитела к PD-1 (последовательности CDR) (SEQ ID NO:2)

DIQLTQSPSFLSA YVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTLHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQH YSSYPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Полипептид тяжелой цепи антитела к PD-1 с сигнальной последовательностью (SEQ ID NO:5)

MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSTISGGGSYTYQDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYAMDYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Полипептид легкой цепи антитела к PD-1 с сигнальной последовательностью (SEQ ID NO:6)

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCDIQLTQSPSFLSA YVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTLHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQHYSSYPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид тяжелой цепи антитела к PD-1 (SEQ ID NO: 3)

GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT AGC TAT GAC ATG TCT TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC

TCA ACC ATT AGT GGT GGT GGT AGT TAC ACC TAC TAT CAA GAC AGT GTG
AAG GGG CGG TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT
CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTA TAT TAC TGT
GCG TCC CCT TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC
ACC GTC TCC TCA GCA TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCG CTA GCA
CCC TGC TCC AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC CTG
GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCA GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC
GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA
GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG
GGC ACG AAG ACC TAC ACC TGC AAC GTA GAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC
AAG GTG GAC AAG AGA GTT GAG TCC AAA TAT GGT CCC CCA TGC CCA CCA
TGC CCA GCA CCT GAG TTC CTG GGG GGA CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCC
CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACG
TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG GTC CAG TTC AAC
TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG
GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC
CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC
AAC AAA GGC CTC CCG TCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA
GGG CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG
GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC
TAC CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG
AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC
TTC CTC TAC AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG GGG
AAT GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC
ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA

Нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид легкой цепи антитела к PD-1 (SEQ ID NO: 4)

GAC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TTC CTG TCT GCA TAT GTA GGA
GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC AAG GCC AGT CAG GAT GTG GGT ACT GCT
GTA GCC TGG TAT CAG CAA AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC
TAT TGG GCA TCC ACC CTG CAC ACT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC
AGT GGA TCT GGG ACA GAA TTC ACT CTC ACA ATC AGC AGC CTG CAG CCT

GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAG CAT TAT AGC AGC TAT CCG TGG
 ACG TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA CGG ACT GTG GCT GCA
 CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAA TTG AAA TCT GGA
 ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC
 AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG
 GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC
 AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC
 GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTC AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC
 TTC AAC AGG GGA GAG TGT

[104] Вышеприведенные последовательности описывают иллюстративное гуманизованное моноклональное антитело к PD-1, в котором в качестве каркасных последовательностей использован ген тяжелой цепи IGHG4*01 человека и ген легкой каппа-цепи IGKC*01 человека. Имеется одиночная точковая мутация Ser в Pro в шарнирной области тяжелой цепи IgG4. Данная мутация находится в каноническом положении S228, соответствующем остатку 243 из SEQ ID NO: 5, которая содержит сигнальную последовательность. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что данная точковая мутация служит для стабилизации шарнирной области тяжелой цепи антитела.

[105] Биофизические и биохимические характеристики данного иллюстративного гуманизованного моноклонального антитела к PD-1 соответствовали ожидаемому паттерну дисульфидных связей для молекулы IgG4. Остатки, вовлеченные в ожидаемые меж- и внутрицепочечные дисульфидные связи, приведены в таблице ниже (таблицы 1 и 2).

Таблица 1. Ожидаемые остатки, вовлеченные в дисульфидные связи, из тяжелой цепи иллюстративного средства на основе антитела к PD-1 с аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 1.

| ID цистеинового остатка согласно Edelman ^a | Остаток HC mAb к PD-1 (положение в SEQ ID NO: 1) |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| I | 22 |
| II | 96 |
| III | 130 |
| IV | 143 |
| V | 199 |

| | |
|------|-----|
| VI | 222 |
| VII | 225 |
| VIII | 257 |
| IX | 317 |
| X | 363 |
| XI | 421 |

Таблица 2. Ожидаемые остатки, вовлеченные в дисульфидные связи, из легкой цепи иллюстративного средства на основе антитела к PD-1 с аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 2.

| ID цистеинового остатка согласно Edelman ^a | Остаток LC mAb к PD-1 (положение в SEQ ID NO: 2) |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| I | 23 |
| II | 88 |
| III | 134 |
| IV | 194 |
| V | 214 |

[106] В данном иллюстративном антителе к PD-1 присутствует занятый сайт N-гликозилирования по остатку аспарагина 293 в домене CH2 каждой тяжелой цепи в последовательности зрелого белка (SEQ ID NO: 1). Полученное в ходе экспрессии N-гликозилирование по этому сайту представляет собой смесь разновидностей олигосахаридов, как правило, наблюдаемых на IgG, экспрессируемых в культуре клеток млекопитающих, например, ниже показана относительная представленность разновидностей гликанов из препарата данного иллюстративного антитела к PD-1, культивируемого в клетках яичника китайского хомячка (CHO) (таблица 3).

Таблица 3. Анализ гликанов связывающего средства на основе антитела к PD-1

| Разновидность | Представленность (% от общего числа олигосахаридов) | Описание гликана |
|---------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| G0 | <0,1% | Нефукозилированный олигосахарид типа агалактозилированного двухантенного комплекса |
| G0F | 19,5% | Олигосахарид типа агалактозилированного двухантенного комплекса с коровым фукозилированием |

| | | |
|-----|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| G1 | 0,1% | Нефукозилированный олигосахарид типа моногалактозилированного двухантенного комплекса |
| G1F | 45,6% | Олигосахарид типа моногалактозилированного двухантенного комплекса с коровым фукозилированием |
| G2F | 27,4% | Олигосахарид типа галактозилированного двухантенного комплекса с коровым фукозилированием |
| M5 | 0,5% | Олигоманнозидированный N-гликан, Man ₅ GlcNAc ₂ |

ПРИМЕР 2. Связывание иллюстративного антитела к PD-1 с рекомбинантным PD-1

[107] В данном примере описано связывание иллюстративного антитела к PD-1 (с тяжелой и легкой цепями, изложенными под SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно) с рекомбинантными полипептидами PD-1. В частности, в данном примере продемонстрировано высокоаффинное связывание иллюстративного антитела с растворимыми слияниями PD-1 и экспрессируемой клеткой рекомбинантным PD-1, определяемое с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и проточной цитометрии, соответственно.

[108] Анализы SPR выполняли с применением системы Biacore T200, а кинетические константы определяли с применением программного обеспечения для оценки Biacore T200. Экспериментальные параметры выбирали таким образом, что насыщение достигалось при наивысших концентрациях антигена, и значения R_{max} поддерживали ниже 100 единиц ответа (RU). Антитело к IgG человека (Fc-специфическое) от GE иммобилизовали на чипе Biacore CM5. Затем иллюстративное антитело к PD-1 (с тяжелой и легкой цепями, изложенными под SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно) захватывали на этой поверхности с применением химии иммобилизации по аминокгруппе через активированный EDC. Затем димерные белки слияния PD-1 человека или яванского макака (слитые с Fc-областью IgG2a мыши) в виде серии двукратных серийных разведений пропускали над захваченным иллюстративным антителом и отслеживали диссоциацию. Захват и связывание аналита проводили в буфере HBS-EP+. Чипы регенерировали после каждого цикла с применением 3 М MgCl₂. Полученные сенсограммы подвергали глобальной

аппроксимации с применением модели связывания 1:1 для расчета скорости ассоциации и диссоциации ($k_{\text{ассоц.}}$ и $k_{\text{диссоц.}}$, соответственно) и констант диссоциации как меры общей аффинности (KD). Результаты SPR показали, что иллюстративное антитело к PD-1 связывает PD-1 человека и яванского макака при высокой скорости ассоциации, низкой скорости диссоциации и высоким показателем общей аффинности (таблица 4). Кроме того, кинетические показатели связывания с PD-1 человека и яванского макака были аналогичными, при этом наблюдалось менее чем 2-кратное отличие в значениях KD.

[109] Исследования с применением проточной цитометрии проводили на клонах линии клеток CHO-K1, в которые был стабильно трансфицирован полноразмерный нативный PD-1 человека или яванского макака. Иллюстративное антитело к PD-1 (с тяжелой и легкой цепями, изложенными под SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно) разводили в виде 3-кратных разведений. Разведения иллюстративного антитела добавляли к клеткам CHO-K1 экспрессирующим PD-1 человека или яванского макака (клеткам 1×10^5), и инкубировали на льду. Клетки дважды промывали и инкубировали на льду с антителом мыши к IgG4 человека, конъюгированным с PE, для выявления связывания антитела. Клетки промывали и ресуспендировали в присутствии пропидия йодида для исключения мертвых клеток, фиксировали и анализировали на флуоресценцию на устройстве BD FACSAray (BD Biosciences). Данные анализировали в отношении средней интенсивности флуоресценции, наносили на график и кривые аппроксимировали для расчета значения EC50 с помощью GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) с применением анализа нелинейной (сигмоидной) регрессии. Обнаружили, что данное иллюстративное антитело к PD-1 связывается с PD-1 человека и яванского макака, находящимся на поверхности клетки, с EC₅₀, составляющей 2,0 и 3,4 нМ, соответственно (таблица 4).

Таблица 4. Связывание иллюстративного антитела к PD-1 с PD-1 по результатам поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и анализа с применением клеток CHO-K1, экспрессирующих PD-1

| | Кинетические параметры (SPR) | | | Клетки CHO-K1, экспрессирующие PD-1 |
|-----|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| Вид | $K_{\text{ассоц.}}$ (M ⁻¹ s ⁻¹) | $K_{\text{диссоц.}}$ (s ⁻¹) | K _D (нМ) | EC ₅₀ (нМ) |

| | Кинетические параметры (SPR) | | | Клетки CHO-K1, экспрессирующие PD-1 |
|----------------|------------------------------|----------------------|------|-------------------------------------|
| Человек | $5,7 \times 10^5$ | $1,7 \times 10^{-4}$ | 0,30 | 2,0 |
| Яванский макак | $4,3 \times 10^5$ | $2,3 \times 10^{-4}$ | 0,53 | 3,4 |

[110] $K_{\text{ассоц.}}$ = константа скорости ассоциации; $K_{\text{диссоц.}}$ = константа скорости диссоциации; K_D = константа диссоциации.

[111] В данном примере продемонстрировано, что антитела к PD-1, охватываемые объемом настоящего изобретения, могут связываться с полипептидами PD-1 с высокой аффинностью.

ПРИМЕР 3. Занятость рецепторов иллюстративным антителом к PD-1

[112] В данном примере описана способность иллюстративного антитела к PD-1 (с тяжелой и легкой цепями, изложенными под SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно) занимать нативный PD-1, экспрессированный на мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) человека и яванского макака.

[113] В данных исследованиях использовали PBMC от здоровых доноров-людей или яванских макаков. PBMC человека выделяли из лейкоцитарных пленок, полученных из Центра крови штата Индиана, а PBMC яванского макака выделяли из периферической крови, собранной в асептических условиях в гепарин натрия, которая была получена от Worldwide Primates, Inc. В обоих случаях разделение проводили с помощью фикола с применением Ficoll-Paque 1.077 и осуществляли криоконсервацию для использования в дальнейшем.

[114] В день проведения экспериментов криоконсервированные клетки размораживали и концентрацию клеток доводили до 2×10^6 клеток/мл перед тем, как оставить на ночь при 37°C в увлажненном инкубаторе с CO_2 . Затем клетки осаждали, ресуспендировали в 1 мл среды и повторно подсчитывали. Концентрацию клеток доводили до 4×10^5 клеток/150 мкл среды. Человеческую сыворотку A/B (40 мкл/мл) добавляли для блокирования Fc-рецепторов. После центрифугирования клетки инкубировали с иллюстративным антителом к PD-1 при 4°C . Затем PBMC трижды промывали перед тем, как разделить на две части с обработкой в различных условиях. Один набор клеток инкубировали с иллюстративным антителом к PD-1, а другой набор - с IgG4 в течение 30 минут при 4°C . Затем PBMC промывали четыре раза перед тем,

как провести окрашивание FITC-меченными антителами к CD3 и PE-меченными антителами к IgG4. Клетки промывали и фиксировали перед проведением анализа с применением проточной цитометрии. Для каждого параметра определяли количество CD3+/IgG4+ клеток, а процент занятости иллюстративным антителом к PD-1 определяли следующим образом:

[количество CD3+/IgG4+ клеток в случае клеток, обработанных IgG4, при указанной концентрации антитела к PD-1 во время предварительной инкубации]

деленное на

[количество CD3+/IgG4+ клеток в случае клеток, обработанных антителом к PD-1, при указанной концентрации антитела к PD-1 во время предварительной инкубации].

[115] В случае PBMC, предварительно инкубированных с иллюстративным антителом к PD-1, клетки, как обработанные IgG4, так и обработанные антителом к PD-1, давали большое количество CD3+/IgG4+ клеток. По мере того, как уровень иллюстративного антитела к PD-1 снижали в ходе стадии предварительной инкубации, количество выявляемых CD3+/IgG4+ клеток в случае клеток, обработанных IgG4, неуклонно снижалось, что указывает на зависимую от концентрации занятость PD-1 иллюстративным антителом к PD-1 (**фигура 1**).

[116] В данном примере продемонстрировано, что антитела к PD-1, охватываемые объемом настоящего изобретения, могут связывать нативно экспрессированный PD-1 и, кроме того, занятость PD-1 на PBMC типичными антителами к PD-1 зависит от концентрации.

ПРИМЕР 4. Иллюстративное антитело к PD-1 блокирует взаимодействие PD-1 с PD-L1 и PD-L2

[117] В данном примере описана способность иллюстративного антитела к PD-1 (с тяжелой и легкой цепями, изложенными под SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно) предотвращать взаимодействие PD-1 с его когнатными лигандами, PD-L1 и PD-L2.

[118] В данных исследованиях белки слияния PD-L1 и PD-L2 человека с Fc IgG1 мыши экспрессировали, очищали и метили с помощью DyL650. Определили дозозависимый эффект связывания PD-L1 и PD-L2 с клетками CHO-K1, экспрессирующими PD-1. Для количественной оценки блокирования связывания

лиганда с клетками CHO-K1, экспрессирующими PD-1, иллюстративное антитело против PD-1 или контрольное антитело IgG4 в виде серии 3-кратных разведений предварительно смешивали с PD-L1-mFc-DyL650 или PD-L2-mFc-DyL650. Смесь добавляли к клеткам CHO-K1, экспрессирующим PD-1 человека (3E5 клеток), и инкубировали при 4°C. Клетки промывали один раз и ресуспендировали в присутствии пропидия йодида и DyL650-PD-L1 или DyL650-PD-L2. Связывание анализировали на BD FACSAarray (BD Bioscience) с исключением мертвых клеток. Данные анализировали в отношении средней интенсивности флуоресценции и аппроксимировали кривые для вычисления IC₅₀ применением нелинейного регрессионного анализа в GraphPad Prism (Graphpad Software, Inc.). Обнаружили, что, в отличие от контрольного антитела IgG4, иллюстративное антитело к PD-1 (с тяжелой и легкой цепями, изложенными под SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно) могли эффективно ингибировать взаимодействие PD-1 с PD-L1 и PD-L2 (таблица 5).

Таблица 5. Активность иллюстративного антитела к PD-1 в ингибировании взаимодействия PD-1, экспрессируемого клетками, с растворимыми PD-L1 и PD-L2

| Антитело | IC ₅₀ (нМ) конкурентного связывания PD-L1/PD-1 на клетках CHO-K1 | IC ₅₀ (нМ) конкурентного связывания PD-L2/PD-1 на клетках CHO-K1 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Иллюстративное антитело к PD-1 (с тяжелой и легкой цепями, изложенными под SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно) | 1,8 | 1,5 |

[119] В данном примере продемонстрировано, что антитела к PD-1, охватываемые объемом настоящего изобретения, могут блокировать связывание лигандов PD-1, таких как PD-L1 и PD-L2.

[120] Таким образом, после описания по меньшей мере некоторых аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения, должно быть понятно, что различные изменения, модификации и улучшения будут очевидны для специалистов в данной области. Подразумевается, что такие изменения, модификации и улучшения являются частью настоящего раскрытия, и подразумевается, что они находятся в пределах сущности и объема настоящего изобретения. Соответственно,

вышеприведенное описание приведено исключительно в качестве примера, а настоящее изобретение подробно описано в нижеследующей формуле изобретения.

[121] Все цитируемые в данном документе литературные источники, включая публикации, патентные заявки и патенты, тем самым включены в данный документ посредством ссылки, в равной мере, как если бы было указано, что каждый литературный источник индивидуально и специально включен посредством ссылки и изложен во всей своей полноте в данном документе.

[122] Использование терминов в единственном числе и во множественном числе, а также фраз «по меньшей мере один» и подобных референтов в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте нижеследующей формулы изобретения) следует рассматривать, как охватывающее не только форму единственного числа, но и форму множественного числа, если в данном документе не указано иное, или если это явно не противоречит контексту. Использование термина «по меньшей мере один», за которой следует перечисление одного или более элементов (например, «по меньшей мере один из А и В»), следует рассматривать, как означающее один элемент, выбранный из перечисленных элементов (А или В) или любую комбинацию двух или более перечисленных элементов (А и В), если в данном документе не указано иное, или если это явно не противоречит контексту. Термины «состоящий», «имеющий», «включающий» и «содержащий» следует рассматривать как неограничивающие термины (т. е. означающие «включающий без ограничения»), если не указано иное. Предусматривается, что указание диапазонов значений в данном документе служит исключительно в качестве сокращенного способа указания каждого отдельного значения в пределах диапазона, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание так, как если бы оно указывалось в данном документе индивидуально. Все способы, описываемые в данном документе, могут быть осуществлены в любом удобном порядке, если в данном документе не указано иное, или если это явно не противоречит контексту. Использование всех без исключения примеров или типичных фраз (например, «такой как»), представленных в данном документе, предназначено исключительно для лучшего освещения настоящего изобретения, а не для ограничения объема настоящего изобретения, если не заявлено иное. Ни одна фраза в описании не должна рассматриваться как указание того, что

какой-либо незаявленный элемент является необходимым для осуществления настоящего изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> АНАПТИСБИО, ИНК.
ТЕСАРО, ИНК.

<120> АНТИТЕЛА, НАПРАВЛЕННЫЕ ПРОТИВ БЕЛКА-1 ЗАПРОГРАММИРОВАННОЙ СМЕРТИ (PD-1)

<130> 2009530-0774

<140> PCT/US2017/059618

<141> 2017-11-01

<150> 62/427777

<151> 2016-11-29

<150> 62/416128

<151> 2016-11-01

<160> 6

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 443

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 1

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

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

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

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Gln Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ser Pro Tyr Tyr Ala Met 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

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 210 215 220
 Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 260 265 270
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320
 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 340 345 350
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 405 410 415
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 2

<211> 214

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 2

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Tyr Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Trp Ala Ser Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu 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> 3

<211> 1329

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 3

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|-----|
| gaggtgcagc | tgttggagtc | tgggggaggc | ttggtacagc | ctgggggggc | cctgagactc | 60 |
| tctgtgagc | cctctggatt | cactttcagt | agctatgaca | tgtcttgggt | ccgccaggct | 120 |
| ccaggaagg | ggctggagtg | ggtctcaacc | attagtggtg | gtggtagtta | cacctactat | 180 |
| caagacagt | tgaagggcg | gttcaccatc | tccagagaca | attccaagaa | cacgctgtat | 240 |
| ctgcaaatga | acagcctgag | agccgaggac | acggccgtat | attactgtgc | gtccccctac | 300 |
| tatgctatgg | actactggg | gcaagggacc | acggtcaccg | tctcctcagc | atccaccaag | 360 |
| ggcccatcgg | tcttcccgt | agcaccctgc | tccaggagca | cctccgagag | cacagccgcc | 420 |
| ctgggctgcc | tgggtcaagga | ctacttcccc | gaaccagtga | cgggtgctgtg | gaactcaggc | 480 |
| gcctgacca | gcggcgtgca | caccttcccc | gctgtcctac | agtcctcagg | actctactcc | 540 |
| ctcagcagcg | tgggtaccgt | gccctccagc | agcttgggca | cgaagacctc | cacctgcaac | 600 |
| gtagatcaca | agcccagcaa | caccaaggtg | gacaagagag | ttgagtccaa | atatgggtccc | 660 |

```
cctgccccac catgcccagc acctgagttc ctgggggggac catcagtctt cctgttcccc 720
ccaaaaccca aggacactct catgatctcc cggaccctctg aggtcacgtg cgtgggtgggtg 780
gacgtgagcc aggaagacc ctaggtccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggagggtg 840
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 900
gtcctcaccg tcttgacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 960
aacaaaggcc tcccgtctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1020
gagccacagg tgtacaccct gccccatcc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1080
ctgacctgcc tggtaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1140
gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1200
ttcctctaca gcaggtaac cgtggacaag agcaggtggc aggaggggaa tgtcttctca 1260
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacac agaagagcct ctccctgtct 1320
ctgggtaaa 1329
```

<210> 4

<211> 642

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 4

```
gacatccagt tgaccagtc tccatccttc ctgtctgcat atgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgca aggccagtca ggatgtgggt actgctgtag cctggatca gcaaaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctattgg gcatccacc tgcacactgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcagcat tatagcagct atccgtggac gtttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa acggactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc 360
tctgatgagc aattgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgcc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtac ccatcagggc 600
ctcagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642
```

<210> 5

<211> 462

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 5

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

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Ser Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 210 215 220

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 225 230 235 240

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 245 250 255

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 260 265 270

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 275 280 285

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 290 295 300

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 305 310 315 320

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 325 330 335

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 340 345 350

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 355 360 365

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 420 425 430

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
450 455 460

<210> 6

<211> 236

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
полипептид

<400> 6

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

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe
20 25 30

Leu Ser Ala Tyr Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser
35 40 45

Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Leu His Thr Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His
100 105 110

Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, который способен связывать белок-1 запрограммированной смерти (PD-1), где полипептид содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1.

2. Полипептид тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1.

3. Полипептид тяжелой цепи по п. 2, где полипептид связывает белок-1 запрограммированной смерти (PD-1).

4. Полипептид, который способен связывать белок-1 запрограммированной смерти (PD-1), где полипептид содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2.

5. Полипептид легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2.

6. Полипептид легкой цепи по п. 5, где полипептид связывает PD-1.

7. Полипептид, содержащий полипептид по любому из пп. 1—3 и/или полипептид по любому из пп. 4—6, где полипептид содержит по меньшей мере одну дисульфидную связь, образованную первым цистеином и вторым цистеином, и где

i) первый цистеин выбран из остатка 22, 96, 130, 143, 199, 222, 225, 257, 317, 363 и 421 из SEQ ID NO: 1, а второй цистеин выбран из остатка 23, 88, 134, 194 и 214 из SEQ ID NO: 2;

ii) первый цистеин выбран из остатка 22, 96, 130, 143, 199, 222, 225, 257, 317, 363 и 421 из SEQ ID NO: 1, а второй цистеин выбран из остатка 22, 96, 130, 143, 199, 222, 225, 257, 317, 363 и 421 из SEQ ID NO: 1;

iii) первый цистеин выбран из остатка 23, 88, 134, 194 и 214 из SEQ ID NO: 2, а второй цистеин выбран из остатка 23, 88, 134, 194 и 214 из SEQ ID NO: 2.

8. Полипептид по любому из пп. 1—7, где полипептид содержит по меньшей мере один аспарагин, который является гликозилированным.
9. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1.
10. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2.
11. Выделенная нуклеиновая кислота, последовательность которой содержит SEQ ID NO:3.
12. Выделенная нуклеиновая кислота, последовательность которой содержит SEQ ID NO:4.
13. Вектор, содержащий выделенную последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9—12.
14. Выделенная клетка, содержащая вектор по п. 13.
15. Средство на основе антитела, содержащее полипептид по любому из пп. 1—8.
16. Средство на основе антитела по п. 15, где средство на основе антитела содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого содержит SEQ ID NO: 1, и полипептид, аминокислотная последовательность которого содержит SEQ ID NO: 2.
17. Средство на основе антитела по п. 15 или п. 16, где средство на основе антитела связывает TIM-3.
18. Средство на основе антитела по любому из пп. 15—17, где средство на основе антитела связывается с TIM-3 с K_D от приблизительно 1 пикомоль/л (пМ) до приблизительно 100 микромоль/л (мкМ).
19. Композиция, содержащая (a) полипептид по любому из пп. 1—8, (b) выделенную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 9—12, (c) вектор по п. 13, (d) выделенную клетку по п. 14 или (e) средство на основе антитела по любому из пп. 15—18.

20. Композиция по п. 19, где композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

21. Способ лечения нарушения, которое реагирует на ингибирование PD-1, у млекопитающего, при этом способ предусматривает введение млекопитающему эффективного количества полипептида по любому из пп. 1—8, выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9—12, вектора по п. 13, выделенной клетки по п. 14, средства на основе антитела по любому из пп. 15—18 или композиции по п. 19 или п. 20, за счет чего осуществляется лечение нарушения у млекопитающего.

22. Способ индуцирования иммунного ответа у млекопитающего, имеющего нарушение, которое реагирует на ингибирование PD-1, предусматривающий введение млекопитающему эффективного количества средства против PD-1, выбранного из группы, состоящей из полипептида по любому из пп. 1—8, выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9—12, вектора по п. 13, выделенной клетки по п. 14, средства на основе антитела по любому из пп. 15—18 или композиции по п. 19 или п. 20, с индуцированием тем самым иммунного ответа у млекопитающего.

23. Способ усиления иммунного ответа или повышения активности иммунной клетки у млекопитающего, имеющего нарушение, которое реагирует на ингибирование PD-1, предусматривающий введение указанному млекопитающему эффективного количества средства против PD-1, выбранного из группы, состоящей из полипептида по любому из пп. 1—8, выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9—12, вектора по п. 13, выделенной клетки по п. 14, средства на основе антитела по любому из пп. 15—18 или композиции по п. 19 или п. 20, с усилением или повышением тем самым иммунного ответа или активности иммунной клетки у млекопитающего.

24. Способ по п. 22 или п. 23, где иммунный ответ представляет собой гуморальный или опосредованный клетками иммунный ответ.

25. Способ по п. 24, где иммунный ответ представляет собой CD4 или CD8 T-клеточный ответ.

26. Способ по п. 24, где иммунный ответ представляет собой B-клеточный ответ.

27. Способ по любому из пп. 21—26, где нарушение представляет собой рак.
28. Способ по п. 27, где рак представляет собой:
- i) рак, ассоциированный с высокой мутационной нагрузкой опухоли (TMB);
 - ii) рак, который является стабильным по микросателлитам (MSS),
 - iii) рак, который характеризуется микросателлитной нестабильностью,
 - iv) рак, который имеет статус высокой микросателлитной нестабильности (MSI-H),
 - v) рак, который имеет статус низкой микросателлитной нестабильности (MSI-L),
 - vi) рак, ассоциированный с высокой TMB и MSI-H,
 - vii) рак, ассоциированный с высокой TMB и MSI-L или MSS,
 - viii) рак, который имеет дефектную систему репарации ошибочного спаривания ДНК,
 - ix) рак, который имеет дефект в гене репарации ошибочного спаривания ДНК,
 - x) гипермутированный рак,
 - xi) рак, содержащий мутацию в полимеразе эpsilon (POLE),
 - xii) аденокарциному, рак эндометрия, рак молочной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак фаллопиевых труб, рак яичка, первичный рак брюшины, рак толстой кишки, рак толстой и прямой кишки, рак желудка, рак тонкого кишечника, плоскоклеточную карциному аногенитальной области, меланому, почечноклеточную карциному, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак печени, рак щитовидной железы, рак гортани, рак слюнных желез, рак пищевода, рак головы и шеи, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, мезотелиому, карциному из клеток Меркеля, саркому, глиобластома и гематологический рак, такой как множественная миелома, В-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома, лимфома

Ходжкина/первичная медиастинальная В-клеточная лимфома или хронический миелогенный лейкоз, или

xiii) рак из xii), где рак представляет собой рак с MSS или MSI-L, характеризуется микросателлитной нестабильностью, представляет собой рак с MSI-N, имеет высокую TMB, имеет высокую TMB и представляет собой рак с MSS или MSI-L, имеет высокую TMB и представляет собой рак с MSI-N, имеет дефектную систему репарации ошибочного спаривания ДНК, имеет дефект в гене репарации ошибочного спаривания ДНК, представляет собой гипермутированный рак или содержит мутацию в полимеразе эpsilon (POLE).

29. Способ по любому из пп. 21—26, где нарушение представляет собой инфекционное заболевание.

30. Способ по п. 29, где инфекционное заболевание вызвано вирусом или бактерией.

31. Способ по п. 30, где вирус представляет собой вирус иммунодефицита человека (HIV), респираторно-синцитиальный вирус (RSV), вирус гриппа, вирус денге или вирус гепатита В (HBV).

32. Способ по любому из пп. 21—26, где нарушение представляет собой аутоиммунное заболевание.

33. Способ по п. 32, где аутоиммунное заболевание представляет собой рассеянный склероз, сахарный диабет 1 типа, ревматоидный артрит, склеродермию, болезнь Крона, псориаз, системную красную волчанку (SLE) или язвенный колит.

34. Способ по любому из пп. 21—33, где млекопитающему вводили или будут вводить средство, которое ингибирует TIM-3, вследствие чего млекопитающее получает оба средства.

35. Способ по п. 34, где средство, которое ингибирует TIM-3, представляет собой связывающее TIM-3 средство.

36. Способ по п. 35, где связывающее TIM-3 средство представляет собой антитело, конъюгат антитела или его антигенсвязывающий фрагмент.

37. Способ по любому из пп. 21—36, где млекопитающему вводили или будут вводить средство, которое ингибирует LAG-3, вследствие чего млекопитающее получает оба средства.

38. Способ по п. 37, где средство, которое ингибирует LAG-3, представляет собой связывающее LAG-3 средство.

39. Способ по п. 38, где связывающее LAG-3 средство представляет собой антитело, конъюгат антитела или его антигенсвязывающий фрагмент.

40. Способ по п. 38 или п. 39, где млекопитающее получает лечение каждым из средства против PD-1, средства, которое ингибирует TIM-3, средства, которое ингибирует LAG-3, вследствие чего млекопитающее получает все три средства.

41. Способ по любому из пп. 21—40, где млекопитающему вводили или будут вводить средство, которое ингибирует PARP, вследствие чего млекопитающее получает оба средства.

42. Способ по п. 41, где средство, которое ингибирует PARP, представляет собой малую молекулу, нуклеиновую кислоту, полипептид (например, антитело), углевод, липид, металл или токсин.

43. Способ по п. 41 или п. 42, где средство, которое ингибирует PARP, выбрано из группы, состоящей из ABT-767, AZD 2461, BGB-290, BGP 15, CEP 8983, CEP 9722, DR 2313, E7016, E7449, флузопариба (SHR 3162), IMP 4297, INO1001, JPI 289, JPI 547, конъюгата моноклональное антитело B3-LysPE40, MP 124, нирапариба (ZEJULA) (MK-4827), NU 1025, NU 1064, NU 1076, NU1085, олапариба (AZD2281), ONO2231, PD 128763, R 503, R554, рукапариба (RUBRACA) (AG-014699, PF-01367338), SBP 101, SC 101914, симмипариба, талазопариба (BMN-673), велипариба (ABT-888), WW 46, 2-(4-(трифторметил)фенил)-7,8-дигидро-5H-тиопирано[4,3-d]пиримидин-4-ола и их солей или производных.

44. Способ по любому из пп. 41—43, где млекопитающее получает лечение каждым из средства против PD-1, средства, которое ингибирует TIM-3, или средства, которое ингибирует LAG-3, и средства, которое ингибирует PARP, вследствие чего млекопитающее получает все три средства.

45. Способ по п. 44, где способ дополнительно предусматривает получение млекопитающим лечения средством, которое ингибирует LAG-3 или TIM-3, вследствие чего млекопитающее получает все четыре средства.
46. Способ по любому из пп. 21—45, где млекопитающее не поддается лечению средством, которое ингибирует PD-1.
47. Способ по любому из пп. 21—46, где млекопитающее плохо поддается лечению средством, которое ингибирует PD-1.
48. Способ по любому из пп. 21—47, где способ повышает чувствительность млекопитающего к лечению средством, которое ингибирует PD-1.
49. Способ по любому из пп. 21—48, где млекопитающее содержит истощенную иммунную клетку.
50. Способ по п. 49, где истощенная иммунная клетка представляет собой истощенную Т-клетку.
51. Способ по любому из пп. 21—50, где млекопитающее представляет собой человека.
52. Способ по любому из пп. 21—51, где млекопитающее ранее получало лечение одним или более различными способами лечения рака.
53. Способ по п. 52, где млекопитающее ранее получало лечение одним или более из хирургической операции, радиотерапии, химиотерапии или иммунотерапии.
54. Способ по п. 52 или п. 53, где млекопитающее ранее получало лечение цитотоксической терапией.
55. Способ по любому из пп. 21—54, где способ дополнительно предусматривает применение другого терапевтического средства или лечения.
56. Способ по п. 55, где способ дополнительно предусматривает применение одного или более из хирургической операции, радиотерапии, химиотерапии, иммунотерапии, противоангиогенного средства или противовоспалительного средства.

57. Способ получения полипептида по любому из пп. 1—8 посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, в культуре клетки-хозяина.

58. Способ получения средства на основе антитела по любому из пп. 15—18 посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей средство на основе антитела, в культуре клетки-хозяина.

59. Способ получения композиции по п. 19 или п. 20 посредством объединения полипептида по любому из пп. 1—8, выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9—12, вектора по п. 13, выделенной клетки по п. 14 или средства на основе антитела по любому из пп. 15—18 с фармацевтически приемлемым носителем и получения состава для введения субъекту.

60. Способ по п. 59, где стадия получения состава для введения предусматривает получение состава для парентеральной доставки.

61. Способ получения полипептида по любому из пп. 1—8, выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9—12, вектора по п. 13, выделенной клетки по п. 14, средства на основе антитела по любому из пп. 15—18 или композиции по п. 19 или п. 20 для применения в одном из способов по любому из пп. 21—56.

ФИГУРА 1

