

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035037**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.21

(21) Номер заявки
201691225

(22) Дата подачи заявки
2014.11.14

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

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

(31) **201310681942.6**

(32) **2013.12.12**

(33) **CN**

(43) **2016.09.30**

(86) **PCT/CN2014/091090**

(87) **WO 2015/085847 2015.06.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

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

(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) **CN-A-102892785
CN-A-1259961**

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

B1**035037****035037****B1**

Область техники

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

Уровень техники

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

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

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

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

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

В настоящее время несколько транснациональных фармацевтических компаний занимаются моноклональными антителами к PD-1, которые максимизируют собственный иммунный ответ пациентов против опухоли, блокируя связывание PD-L1/PD-1, и впоследствии достигают цели элиминации опухолевых клеток, как описано в WO2009114335. Согласно результатам клинических исследований моноклональных антител к PD-1 компаний BMS и Merck, определенный уровень ответа наблюдали при немелкоклеточном раке легкого, меланоме и раке почки, и при этом указанный уровень ответа демонстрирует заметно высокую релевантность с экспрессией PD-L1 в опухолях, что означает, что антитело к PD-1 оказывает положительное воздействие на опухоли.

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

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предложено антитело к PD-1 или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, который содержит: вариабельную область легкой цепи, содержащую по меньшей мере одну LCDR, выбранную из тех последовательностей, которые представлены в: SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8; и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере одну HCDR, выбранную из тех последовательностей, которые представлены в: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4

стантную область тяжелой цепи человеческого IgG2 или IgG4, или IgG1, которая не обладает ADCC (антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью) после мутации аминокислоты.

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

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

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

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

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

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения гуманизированное антитело к PD-1 или его фрагмент, предложенный в настоящем документе, дополнительно содержит константную область легкой цепи человеческой κ -, λ -цепи или ее вариант.

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

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, в соответствии с предложенным в настоящем документе гуманизированным антителом к PD-1 или его фрагментом, последовательность FR тяжелой цепи переменной области тяжелой цепи гуманизированного антитела получена из комбинации последовательностей тяжелых цепей зародышевой линии человека IgHV3-7 и JH6, как представлено в SEQ ID NO: 13, содержащей FR1, FR2 и FR3 IgHV3-7 и FR4 JH6.

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

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

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

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

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

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

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, в соответствии с предложенной в настоящем документе клеткой-хозяином, указанная клетка-хозяин представляет собой бактерию, предпочтительно *E. coli*.

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

В настоящем изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая

антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель.

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

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

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 - анализ пролиферации мононуклеарных клеток периферической крови человека. Результаты показывают, что тестируемое антитело к PD-1, mAb005, может эффективно стимулировать пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови человека со значением EC_{50} 83 нг/мл.

Фиг. 2 - анализ секреции цитокина ИФН- γ мононуклеарными клетками периферической крови человека. Результаты показывают, что тестируемое антитело к PD-1, mAb005, может стимулировать пролиферацию МКПК и в то же время эффективно стимулировать секрецию цитокина ИФН- γ со значением EC_{50} 13 нг/мл.

Фиг. 3 - ингибирующее влияние антитела к PD-1 H005-1 на рост клеток глиомы.

Фиг. 4 - диаграмма, демонстрирующая изменение объема опухоли после лечения.

Фиг. 5 - диаграмма, демонстрирующая изменение массы тела мышей после лечения.

Подробное описание сущности изобретения

1. Определения.

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

Используемые в настоящем документе однобуквенный код и трехбуквенный код аминокислот описаны в J. Biol. Chem., 243, (1968) p 3558.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" относится к иммуноглобулину, структуре в виде четырех пептидных цепей, соединенных вместе дисульфидными связями между двумя идентичными тяжелыми цепями и двумя идентичными легкими цепями. Различные константные области тяжелой цепи иммуноглобулинов демонстрируют разные аминокислотные композиции и упорядоченность, таким образом представляя различные виды антигенности. Соответственно, иммуноглобулины можно разделить на пять категорий, или так называемых изотипов иммуноглобулинов, а именно IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, их тяжелые цепи представляют собой μ -цепь, δ -цепь, γ -цепь, α -цепь и ϵ -цепь, соответственно. В соответствии с аминокислотной композицией шарнирной области и числом и расположением дисульфидных связей в тяжелой цепи один и тот же тип Ig можно разделить на различные подкатегории, например, IgG можно разделить на IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. На основании различных константных областей легкую цепь можно разделить на κ - или λ -цепь. Каждый из пяти Ig может иметь κ - или λ -цепь.

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

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

Последовательность тяжелых цепей и легких цепей антитела возле N-конца, состоящая из около 110 аминокислот, которая обладает значительной переменностью, известна как переменная область (V-область); оставшаяся часть аминокислотной последовательности возле C-конца является относительно стабильной и известна как константная область (C-область). Переменная область содержит три гиперпеременных участка (HVR) и четыре относительно консервативных последовательности каркасного участка (FR). Эти три гиперпеременных участка определяют специфичность антитела, и также известны как область, определяющая комплементарность (CDR). Каждая переменная область легкой цепи

(LCVR) и каждая переменная область тяжелой цепи (HCVR) состоит из трех CDR и четырех FR, со следующим последовательным порядком от аминоконца к карбоксиконцу: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Три CDR легкой цепи называют LCDR1, LCDR2 и LCDR3; три CDR тяжелой цепи называют HCDR1, HCDR2 и HCDR3. Количество и расположение аминокислотных остатков CDR в LCVR и HCVR антитела или антигенсвязывающего фрагмента в настоящем документе соответствуют известным критериям нумерации по Kabat (LCDR1-3, HCDR2-3) или соответствуют критериям нумерации по Kabat и Chothia (HCDR1).

Термин "мышинное антитело" в настоящем изобретении относится к моноклональному антителу к PD-1 человека, полученному в соответствии со знаниями и практическим опытом в данной области техники. Во время получения исследуемому объекту инъецировали антиген PD-1, а затем выделяли гибридому, экспрессирующую антитело, обладающее требуемой последовательностью или функциональными характеристиками. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мышинное антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область легкой цепи мышинной κ -, λ - цепи или ее вариант, или дополнительно содержит константную область тяжелой цепи мышинного IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, или ее вариант.

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

Термин "гуманизированное антитело", также известный как "CDR-привитое антитело", относится к антителу, создаваемому посредством встраивания (прививания) мышинных последовательностей CDR в каркас переменной области человеческого антитела, а именно, в последовательность другого типа каркаса человеческого антитела зародышевой линии. Гуманизированное антитело преодолевает недостатки сильного иммунного ответа, индуцированного химерным антителом, которое несет в себе большое количество мышинных белковых компонентов. Такие каркасные последовательности могут быть получены из общедоступной базы данных ДНК, включающей в себя последовательности генов антител зародышевой линии или из опубликованных источников. Например, последовательности ДНК зародышевой линии человеческих генов переменной области тяжелой и легкой цепи можно найти в базе данных последовательностей зародышевой линии человека VBase (доступна на веб-сайте www.mrccpe.com.ac.uk/vbase), а также можно найти в публикации Kabat, EA, et al, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мышинные последовательности CDR гуманизированного антитела к PD-1 выбирают из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8. Каркасы переменной области человеческого антитела были разработаны и выбраны таким образом, чтобы последовательность FR легкой цепи переменной области легкой цепи антитела была получена из комбинации последовательностей легких цепей зародышевой линии человека IGKV1-39 и JK4: SEQ ID NO: 14, содержащей FR1, FR2 и FR3 IGKV 1-39 и FR4 JK4; последовательность FR тяжелой цепи переменной области тяжелой цепи антитела получена из комбинации последовательностей тяжелых цепей зародышевой линии человека IgHV3-7 и JH6: SEQ ID NO: 13, содержащей FR1, FR2 и FR3 IgHV3-7 и FR4 JH6. Для того, чтобы избежать снижения активности во время уменьшения иммуногенности, переменную область человеческого антитела подвергают минимальной обратной мутации для поддержания активности.

Используемый в настоящем документе термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к фрагменту Fab, фрагменту Fab', фрагменту F(ab')₂ с антигенсвязывающей активностью, а также к фрагменту Fv, фрагменту sFv, связывающемуся с человеческим PD-1; содержащему одну или более областей CDR антител, описанных в настоящем изобретении, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 до SEQ ID NO: 8. Fv-фрагмент представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит переменную область тяжелой цепи, переменную область легкой цепи и все антигенсвязывающие сайты без константной области. Обычно антитело Fv дополнительно содержит полипептидный линкер меж-

ду доменами VH и VL и способно образовывать структуру, необходимую для связывания антигена. Кроме того, различные линкеры могут быть использованы для соединения вариабельных областей двух антител с образованием полипептида, называемого одноцепочечным антителом или одноцепочечным Fv (sFv). Используемый в настоящем документе термин "связывание с PD-1" означает взаимодействие с человеческим PD-1. Используемый в настоящем документе термин "антигенная детерминанта" по настоящему изобретению относится к не располагающимся непрерывно трехмерным сайтам на антигене, распознаваемым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению.

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

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

Способы получения и очистки антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые хорошо известны в данной области, можно найти, например, в книге *Antibody Experimental Technology Guide of Cold Spring Harbor*, глава 5-8 и 15. Например, мыши могут быть иммунизированы человеческим PD-1 или его фрагментами, а полученные антитела могут быть ренатурированы, очищены и секвенированы с использованием обычных способов, хорошо известных в данной области техники. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть также получены обычными способами. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению генетически модифицируют, чтобы ввести один или более человеческих каркасных участков (FR) в CDR, полученную не от человека. Последовательности FR зародышевой линии человека можно получить из базы данных ImMunoGeneTics (IMGT) через их вебсайт <http://imgt.cines.fr>, или из книги *The Immunoglobulin FactsBook*, 2001 ISBN 012441351. В частности, FR легкой цепи зародышевой линии для использования в антителе или антигенсвязывающем фрагменте по настоящему изобретению включает A3 и 02. В частности, FR тяжелой цепи зародышевой линии для использования в антителе или антигенсвязывающем фрагменте по настоящему изобретению включает VH3-21 и VH3-23.

Сконструированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут быть получены и очищены с использованием обычных способов. Например, последовательности кДНК, кодирующие тяжелую цепь (SEQ ID NO: 11) и легкую цепь (SEQ ID NO: 12), можно клонировать и рекомбинировать в экспрессионный вектор GS. Экспрессионным вектором рекомбинантного иммуноглобулина можно затем стабильно трансфицировать клетки CHO. Как более рекомендуемый способ, хорошо известный в данной области техники, экспрессия антител в клетках млекопитающих приводит к гликозилированию, как правило, в высококонсервативном N-конце области FC. Стабильные клоны могут быть получены путем экспрессии антитела, специфически связывающегося с человеческим PCSK9. Положительные клоны можно выращивать в культуральной среде, не содержащей сыворотки, для продуцирования антител в биореакторах. Культуральную среду, в которой было секретировано антитело, можно очищать посредством обычных методик. Например, среду можно легко вводить в колонку Sepharose FF, заполненную белком A или белком G, уравновешенную совместимым буфером. Колонку промывают для удаления компонентов неспецифического связывания. Связанное антитело элюируют градиентом pH, и фрагменты антител обнаруживают с помощью ДСН-ПААГ, а затем объединяют. Антитело можно фильтровать и концентрировать с использованием обычных методик. Растворимый агрегат и мультимеры можно эффективно удалять с использованием обычных методик, включая гель-фильтрацию или ионный обмен. Полученный продукт может быть немедленно заморожен, например, при -70°C, или он может быть лиофилизирован.

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

Термины "введение" и "обработка" по отношению к животному, человеку, субъекту исследования, клетке, ткани, органу или биологической жидкости относятся к приведению в контакт экзогенного фармацевтического, терапевтического, диагностического средства или композиции с животным, человеком,

субъектом, клеткой, тканью, органом или биологической жидкостью. Термины "введение" и "обработка" могут относиться, например, к терапевтическим, фармакокинетическим, диагностическим, исследовательским и экспериментальным способам. Обработка клетки включает контактирование реагента с клеткой, а также контактирование реагента с жидкостью, причем жидкость находится в контакте с клеткой. Термины "введение" и "обработка" также означают обработку *in vitro* и *ex vivo*, например, клетки, с помощью реагента, диагностического, связывающего соединения или другой клеткой. "Лечение" в отношении человека, субъекта ветеринарии или исследования относится к терапевтическому лечению, профилактическим или превентивным мерам, к применению в исследовании и диагностики.

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

"Консервативные модификации" или "консервативное замещение или замена" относится к заменам аминокислот в белке на другие аминокислоты с аналогичными характеристиками (например, заряд, размер боковой цепи, гидрофобность/гидрофильность, конформация остова и жесткость и т. д.) так, что изменения часто могут быть произведены без влияния на биологическую активность белка. Специалистам в данной области техники будет понятно, что, в основном, одиночные аминокислотные замены в несущественных областях полипептида по сути не изменяют биологическую активность (см., например, Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)). Кроме того, замещения структурно или функционально сходными аминокислотами с меньшей вероятностью нарушают биологическую активность.

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

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

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

Термин "гомология" относится к сходству последовательностей между двумя полинуклеотидными последовательностями или между двумя полипептидами. Когда положение в обеих из двух сравниваемых последовательностей занято одной и той же мономерной субъединицей основания или аминокислоты, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, в таком случае молекулы являются гомологичными по данному положению. Процент гомологии между двумя последовательностями представляет собой функцию от числа совпадающих или гомологичных положений, общих для указанных двух сравниваемых последовательностей, деленных на число сравниваемых положений $\times 100$.

Например, если при оптимальном выравнивании последовательностей 6 из 10 положений в двух последовательностях совпадают или являются гомологичными, тогда указанные последовательности являются на 60 % гомологичными. Обычно сравнение проводят в тех случаях, когда две последовательности при выравнивании имеют максимальный процент гомологии.

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

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

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

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

Подробное описание сущности изобретения

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

Пример 1. Получение антитела.

Были созданы мышинные моноклональные антитела к PD-1 человека. Очищенный рекомбинантный гибридный белок, состоящий из внеклеточного домена PD-1 и Fc (PD-1 Fc) (SEQ ID NO: 1); или клетки CHO, трансфицированные PD-1 (SEQ ID NO: 2) использовали в качестве антигена для иммунизации мышей линии Balb/C и мышей линии SJL. Человеческий антиген PD-1 приобретали в компании ORIGENE, номер по каталогу SC117011, эталонная последовательность NCBI: NM_005018.1.

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

MDMRVPAQLLGLLLWFPGSRCPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATF
TCSFSNTSESFVLNWMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRTQLPNGRDF
HMSVVRARRNDSTYLCGAISLAPKAOIKESLRAELRVTERRAEVPJAHPSPSPR
PAGQFQLVDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK .

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

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEDGNATFT
CSFSNTSESVLWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCFRVTLQPNGRDFH
MSVVRARRNDSTYLCGAISLAPKAQIKESI.RAEL.RVTERRAEVPTAHPSPSRP
AGQFQTLVGVVGGILGSLVLLVWVLAIVCSRAARGTIGARRTGQPI.KEDPSAV
PVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATVFPSPGMGTSSPARRGSADGP
RSAQPLRPEDGHCSWPL .

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

mAb005 HCVR
EYMLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYMSWVRQTPEKRLEWVATISG
GGANTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLSRSEDALYCARQLYFDYW
GQGTTLTVSS SEQID NO: 9

mAb005 LCVR
DIQMTQSPASQSASLGEGVTITCLASQTIGTWLTWYQQKPGKSPQLLIYTATSLA
DGVPSRFGSGSGTKFSFKISLQAEDFVITYCQVYSIPWTFGGGKLEIK
SEQID NO: 10

Последовательности CDR являются следующими:

Название	Последовательность	Нумерация
HCDR1	SYMMS	SEQID NO: 3
HCDR2	TISGGGGANTYYPDSVKG	SEQID NO: 4
HCDR3	QLYFDY	SEQID NO: 5
LCDR1	LASQTIGTWLT	SEQID NO: 6
LCDR2	TATSLAD	SEQID NO: 7
LCDR3	QQVYSIPWT	SEQID NO: 8

Пример 2. Скрининг антител.

Анализ ИФА связывания антитела к PD-1 in vitro.

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

Нейтрализующий авидин (связывающийся с биотином) разбавляли буфером PBS до 1 мкл/мл, добавляя пипеткой в 96-луночный планшет в количестве 100 мкл/лунку, и оставляли на 16-20 ч при температуре 4°C. После удаления буфера PBS 96-луночный планшет промывали один раз PBST (pH 7,4, PBS, содержащий 0,05% твин 20), после чего планшет инкубировали и блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре добавлением 120 мкл/лунку PBST/1% молоко. После удаления блокирующего раствора планшет промывали буфером PBST с последующим добавлением 1 мкг/мл меченного биотином антитела PD1-FC, которое разводили в PBST/1% молоко, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После удаления блокирующего раствора планшет 3 раза промывали буфером PBST с последующим добавлением исследуемого антитела к PD-1, которое разводили до подходящей концентрации в PBST/1% молоко, и инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. После удаления реакционной системы планшет 3 раза промывали буфером PBST с последующим добавлением 100 мкл/лунку меченного HRP вторичного антимышиного антитела (The Jackson Laboratory), которое разводили в PBST/1% молоко, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После трехкратного промывания PBST в планшет добавляли 100 мкл/лунку TMB и инкубировали в течение 5-10 мин при комнатной температуре. Затем реакцию прекращали добавлением 100 мкл/лунку 1 М H₂SO₄. Значение оптической плотности при 450 нм считывали на планшет-ридере NOVOSTar; рассчитывали значение связывания EC₅₀ в ИФА.

Исследуемое антитело	ИФА, ЕС50, нМ	
	PD-1 человека	PD-1 яванского макака
mAb005	0,25	0,27

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

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

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

В данном эксперименте 96-луночный планшет покрывали белком PD-1 с внеклеточным доменом, слитым с FC (PD-1-FC) и инкубировали с исследуемым антителом к PD-1; позже к инкубации добавляли меченный биотином PD-L1. После промывания планшета определяли количество связанного PD-L1, меченного биотином; рассчитывали значение IC_{50} блокирования связывания антитела PD-1 и лиганда PD-L1.

PD-1-FC разбавляли до 1 мкг/мл буфером СВ с pH 9,6 (1,59 г Na_2CO_3 и 2,93 г $NaHCO_3$ растворяли в 1 л дистиллированной воды), добавляли пипеткой в 96-луночный планшет в количестве 100 мкл/лунка и оставляли на 16-20 ч при температуре 4°C. После удаления буфера PBS 96-луночный планшет промывали один раз PBST (pH 7,4, PBS, содержащий 0,05% твин 20), после чего планшет инкубировали и блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре с использованием 120 мкл/лунку PBST/1% молоко. После удаления блокирующего раствора планшет промывали один раз буфером PBST с последующим добавлением 90 мкл исследуемого антитела к PD-1, которое разводили до подходящей концентрации разбавителями образцов (pH 7,4 PBS, содержащий 5% БСА, 0,05% твин 20), и инкубировали в течение 1 ч при 4°C. Затем в планшет добавляли 10-кратные концентрации меченного биотином PD-L1 (Beijing Sino Biological Inc.) (10 мкг/мл) в количестве 10 мкл/лунку, подвергали воздействию вибрации и смешивали с помощью вибрирующей мешалки, и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После удаления реакционной системы планшет 6 раз промывали буфером PBST с последующим добавлением 100 мкл/лунку полимера стрептавидина-пероксидазы который разводили PBST в соотношении 1:400, и инкубировали при воздействии вибрации 50 мин при комнатной температуре. После промывания PBS 6 раз в планшет добавляли 100 мкл/лунку ТМВ и инкубировали в течение 5-10 мин при комнатной температуре. Затем реакцию прекращали добавлением 100 мкл/лунку 1 М H_2SO_4 . Значение оптической плотности при 450 нм считывали на планшет-ридере NOVOSTar; рассчитывали значение IC_{50} блокирования связывания PD-1 и лиганда PD-L1.

Исследуемое	Анализ LBB
антитело	IC_{50} , нМ
mAb005	1,13

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

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

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

Селективно-связывающие белки: PD-1 человека, ICOS человека, CTLA4 человека, CD28 человека и PD-1 мыши (Beijing Sino Biological Inc.), соответственно, разводили до концентрации 1 мкг/мл буфером PBS, добавляли пипеткой в 96-луночный планшет в количестве 100 мкл/лунка и оставляли на 16-20 ч при температуре 4°C. После удаления буфера PBS 96-луночный планшет промывали один раз PBST (pH 7,4, PBS, содержащий 0,05% твин 20), после чего планшет инкубировали и блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре с использованием 120 мкл/лунку PBST/1% молоко. После удаления блокирующего раствора планшет 3 раза промывали буфером PBST с последующим добавлением исследуемого антитела к PD-1, и инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. После удаления реакционной системы планшет 3 раза промывали PBST с последующим добавлением 100 мкл/лунку меченного HRP вторичного антитела против антитела мыши (The Jackson Laboratory), которое разводили в PBST/1% молоке, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет 3 раза промывали PBST с последующим добавлением 100 мкл/лунку ТМВ и инкубировали в течение 5-10 мин при комнатной температуре. Затем реакцию прекращали добавлением 100 мкл/лунку 1 М H_2SO_4 . Значение оптической

плотности при 450 нм считывают на планшет-ридеере NOVOSTar.

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

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

Пример 4. Клеточный анализ связывания антитела к PD-1 *in vitro* FACS (клеточный сортировщик с активацией флуоресценции) представляет собой способ исследования для обнаружения взаимодействия белков и клеток. Анализ используют для обнаружения активности связывания антитела к PD-1 с нативным PD-1, экспрессируемым на поверхности клетки. Клетки, используемые в анализе, представляли собой клетки CHO с высоким уровнем экспрессии PD-1 (см. Пример 1, клетки CHO, трансфицированные PD-1 (SEQ ID NO: 2)).

Клетки CHO с высоким уровнем экспрессии PD-1 центрифугировали со скоростью 1000 об/мин в течение 5 мин, и осадок собирали и суспендировали с 10-15 мл предварительно охлажденного проточного буфера для подсчета клеток. Клетки центрифугировали со скоростью 1000 об/мин в центрифужных пробирках объемом 50 мл в течение 5 мин и собирали. После удаления надосадочной жидкости осадок повторно суспендировали с предварительно охлажденным блокирующим буфером, с плотностью $0,5-1,0 \times 10^6$ клеток/мл. После инкубации при 4°C в течение 30 минут, повторную суспензию добавляли пипеткой в 96-луночный планшет в количестве 100 мкл/лунку. 96-луночный планшет центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин, супернатант утилизировали. В каждую лунку добавляли 100 мкл первичного антитела; клетки ресуспендировали и инкубировали в темноте в течение 60 мин при 4°C. После центрифугирования и утилизации супернатанта добавляли 100 мкл FITC-меченного вторичного антитела (BD Biosciences), разведенного в соотношении 1:400. Клетки ресуспендировали и инкубировали в темноте в течение 60 мин при 4°C. Клетки дважды промывали проточным буфером, ресуспендировали и фиксировали 1% параформальдегидом для анализа проточной цитометрии.

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

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

Пример 5. Анализ аффинности и кинетики связывания *in vitro*.

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

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

Исследуемое антитело	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	K_D (M)
mAb005	1,057E+5	3,769E-4	3,566E-9

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

Пример 6. Цитологический анализ *in vitro*.

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

Плотность свежих МКПК доводили до 2×10^6 /мл, высевали в 6-луночный планшет в количестве 2 мл/лунку и инкубировали в течение 6 часов при 37°C, 5% CO₂. После утилизации взвешенных клеток каждую лунку с адгезивными клетками смешивали с 2 мл среды RPMI1640, содержащей 100 нг/мл GM-

CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий биологический фактор) и 100 нг/мл ИЛ-4, и после инкубации в течение 2 дней добавляли еще 1 мл среды RPMI1640, содержащей 100 нг/мл GM-CSF и 100 нг/мл ИЛ-4, затем клетки непрерывно культивировали в течение 2 дней с последующим добавлением в каждую лунку 100 нг/мл ФНО- α (фактор некроза опухоли- α), и культивировали в течение еще 2 дней, чтобы получить зрелые дендритные клетки. Дендритные клетки и аллогенные Т-клетки, соответственно, центрифугировали и ресуспендировали в концентрации 1×10^6 /мл и 1×10^5 /мл, добавляли пипеткой в 96-луночный планшет в количестве 100 мкл/лунка с последующим добавлением 20 мкл/лунка антител, которые разводили PBS до различных градиентов концентрации, и клетки культивировали в термостате при температуре 37°C, 5% CO₂ в течение 5 дней. После этого отбирали 100 мкл клеточной культуры, чтобы обнаружить пролиферацию клеток с помощью люминесцентного набора для определения жизнеспособности клеток CellTiter-Glo®. Результаты, показанные на фиг. 1, указывают, что тестируемое антитело к PD-1, mAb005, может эффективно стимулировать пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови человека со значением EC₅₀ 83 нг/мл. В оставшемся образце проводили обнаружение секреции цитокина ИФН- γ . Результаты, показанные на фиг. 2, демонстрируют, что тестируемое антитело к PD-1, mAb005, может стимулировать пролиферацию МКПК и в то же время эффективно стимулировать секрецию цитокина ИФН- γ со значением EC₅₀ 13 нг/мл.

Пример 7. Гуманизация мышиного антитела.

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

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWSWVRQAPGKGLEWVANIKQ
DGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGQGT
TVSS;

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQKPKGAPKLLIYAAS
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFGGGTKVEIK .

CDR мышиного антитела прививали к выбранной матрице гуманизации, замещая CDR матрицы человека, после чего выполняли рекомбинацию с константной областью IgG4 с получением гуманизированного антитела H005-1. Затем на основе трехмерной структуры мышиного антитела, внедренные остатки, остатки непосредственно взаимодействующие с CDR и остатки, которые существенно влияют на конформацию VL и VH, подвергали обратной мутации для получения следующих последовательностей гуманизированных антител H005-2, H005-3 и H005-4.

Экспрессия антител

H005-1 HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYMMWSWVRQAPGKGLEWVATISG
GGANTYYPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLYFYFDY
WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYTPPEPTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKR
VESKYGPCCPPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSYMHEAL
HNHYTQKSLSLIGK

SEQ ID NO: 11

H005-1 LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCLASQTIGTWLTWYQKPKGAPKLLIYTATSLA
DGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQVYSIPWTFGGGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSITYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 12

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

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

кДНК синтезировали в соответствии с аминокислотными последовательностями легкой цепи и тяжелой цепи каждого гуманизированного антитела (SEQ NO 11, SEQ NO 12 и их варианты). После расщепления кДНК с помощью XhoI и BamHI, полученные фрагменты кДНК встраивали в экспрессионные векторы pcDNA3.1 (Life Technologies номер по каталогу V790-20) на сайтах рестрикции BamHI/XhoI. Экспрессионные векторы и реагент для трансфекции PEI (Polysciences, Inc. номер по каталогу 23966) использовали для трансфекции клеток HEK293 (Life Technologies номер по каталогу № 11625019) в соотношении 1: 2, и трансфицированные клетки инкубировали в термостате с CO₂ в течение 4-5 суток. Экспрессированные антитела выделяли центрифугированием и очищали в соответствии с общепринятым способом с получением гуманизированных антител по настоящему изобретению.

Пример 8. Данные об активности гуманизированных антител.

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

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

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

Пример 9. Ингибирование роста опухолевых клеток антителом к PD-1.

1. Материалы эксперимента.

Клетки U87MG (клетки глиомы): приобретали в банке клеток Китайской академии наук, номер по каталогу TCHu 138; МКПК (моноклеарные клетки периферической крови человека) приобретали в центре крови в Шанхае (Shanghai Blood Center); CD3: приобретали у Miltenyi Biotec, номер по каталогу 130-093-387; CD28: приобретали у Miltenyi Biotec, номер по каталогу 130-093-375.

Набор для подсчета клеток Cell Counting Kit-8: приобретали у DOJINDO LABORATORIES, номер по каталогу CK04; mIgG (отрицательный контроль): приобретали у SANTA CRUZ номер по каталогу sc-2025; используемая доза 1660 нг/мл.

2. Способы эксперимента.

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

2) Антитело H005-1 разводили до различных градиентов концентрации (как показано на оси абсцисс фиг. 3) с использованием PBS, добавляли в 96-луночный планшет в количестве 10 мкл/лунку и инкубировали в термостате при 37°C, 5% CO₂ в течение 4 ч.

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

4) После 72 ч инкубации в термостате при 37°C, 5% CO₂ в каждую лунку для развития добавляли 10 мкл ССК8. Через 2 ч определяли OD450.

3. Результаты.

Результат показан на фиг. 3; по сравнению с mIgG (отрицательный контроль) различные концентрации антитела к PD-1 (H005-1) оказывали значительное ингибирующее действие на рост клеток U87MQ и степень ингибирования при самой высокой концентрации составляла около 30%.

Пример 10. Активность H005-1 в отношении пролиферации стимулированных туберкулином МКПК.

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

К 15 мл свежих МКПК, около 3×10^7 клеток, добавляли 20 мкл туберкулина (Shanghai BiYou Biotechnology, номер по каталогу 97-8800), и смесь инкубировали в термостате в течение 5 дней при температуре 37°C, 5% CO₂. На 6-й день культивированные клетки центрифугировали и ресуспендировали в свежей среде и доводили плотность до 5×10^5 клеток/мл. 190 мкл ресуспендированных клеток высевали в каждую лунку 96-луночного планшета. Гуманизированное антитело H005-1 добавляли в соответствующие лунки 96-луночного планшета в количестве 10 мкл/лунка. Контрольную группу и пустую группу добавляли с 10 мкл PBS. Планшет для культивирования клеток инкубировали в термостате при 37°C, 5% CO₂, а спустя 72 ч определяли пролиферацию МКПК (Promega, номер по каталогу G7571) и секрецию ИФН- γ (Neo Bioscience, номер по каталогу EHC102g).

Получили следующие результаты.

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

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

Примечание: n = 4.

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

Пример 11. Ингибирование подкожно привитой опухоли U-87MG антителом H005-1 100 мкл клеток U87 (5×10^6 клеток) прививали подкожно в правое подреберье мышам линии SCID-Beige. После того как через 7-10 дней опухоль вырастала до 80-100 мм³, мышам линии SCID-Beige за исключением тех, которые имели слишком большую или слишком маленькую массу тела или опухоли, случайным образом распределяли в группу, которой вводили H005-1 в дозе 10 мг/кг, и в группу, которой вводили IgG человека в дозе 10 мг/кг, в зависимости от объема опухоли, причем каждая группа состояла из семи мышей (D0). Два типа МКПК, стимулированных антителом к CD3 в течение 3 суток, смешивали в соотношении 1: 1, и вводили посредством инъекции в опухолевые ткани в концентрации 5×10^5 клеток/60 мкл, в то же время подкожно вводили инъекцию исследуемого антитела, один раз в 7 дней, всего 3 дозы. Два раза в неделю у мышей измеряли объем опухоли и взвешивали их. Данные регистрировали. Объем опухоли (V) рассчитывали как: $V = 1/2 \times a \times b^2$, где a и b соответственно представляют длину и ширину.

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, причем вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8, соответственно; и причем вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:5, соответственно.

2. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, которое представляет собой мышиное антитело или его фрагмент.

3. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, которое представляет собой химерное антитело или его фрагмент.

4. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, в котором последовательность вариабельной области легкой цепи химерного антитела представляет собой SEQ ID NO:10.

5. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, в котором последовательность вариабельной области тяжелой цепи химерного антитела представляет собой SEQ ID NO:9.

6. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, которое представляет собой гуманизированное антитело или его фрагмент.

7. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, в котором каркасная область вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела представляет собой комбинацию последовательности легких цепей зародышевой линии человека IGKV1-39 и JK4 с SEQ ID NO:14, содержащей FR1, FR2 и FR3 IGKV 1-39 и FR4 JK4.

8. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, в котором последовательность легкой цепи гуманизированного антитела представляет собой последовательность SEQ ID NO:12 или ее вариант, где вариант содержит A43S аминокислотную мутацию в вариабельной области легкой цепи.

9. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, в которой вариабельная область тяжелой цепи гуманизированного антитела содержит FR тяжелой цепи человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

10. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.9, где переменная область тяжелой цепи гуманизированного антитела содержит FR тяжелой цепи человеческого IgG2 или IgG4.

11. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, в котором последовательность FR переменной области тяжелой цепи гуманизированного антитела представляет собой комбинацию последовательности тяжелых цепей зародышевой линии человека IgHV3-7 и JH6 с SEQ ID NO:13, содержащей FR1, FR2 и FR3 IgHV3-7 и FR4 JH6.

12. Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, в котором последовательность тяжелой цепи гуманизированного антитела представляет собой последовательность с SEQ ID NO:11 или ее вариант, где вариант содержит G44R аминокислотную мутацию в переменной области тяжелой цепи.

13. Молекула ДНК, кодирующая антитело по любому из пп.1-12.

14. Экспрессионный вектор, содержащий молекулу ДНК по п.13.

15. Клетка-хозяин для продукции антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-12, трансформированная экспрессионным вектором по п.14.

16. Клетка-хозяин по п.15, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой бактерию.

17. Клетка-хозяин по п.16, где клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

18. Клетка-хозяин по п.15, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой дрожжи.

19. Клетка-хозяин по п.18, где клетка-хозяин представляет собой *Pichia pastoris*.

20. Фармацевтическая композиция для лечения PD-1 опосредованного заболевания или расстройства, содержащая антитело к PD-1 или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12 и фармацевтически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель.

21. Применение антитела к PD-1 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-12 при получении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, опосредованного PD-1.

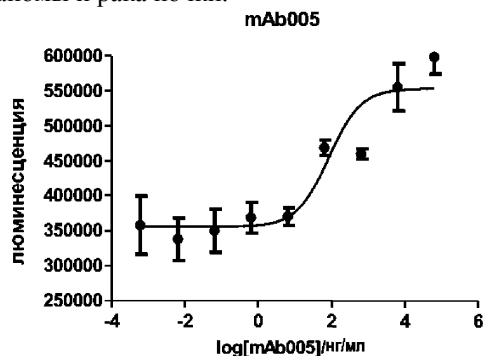
22. Применение фармацевтической композиции по п.20 при получении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, опосредованного PD-1.

23. Применение по п.21 или 22, где заболеванием или расстройством, опосредованным PD-1, является рак.

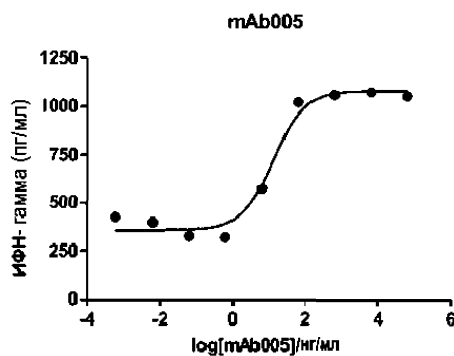
24. Применение по п.23, где раком является рак, экспрессирующий PD-L1.

25. Применение по п.23, где рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака легкого, рака желудка, рака кишечника, рака почки, меланомы и немелкоклеточного рака легкого.

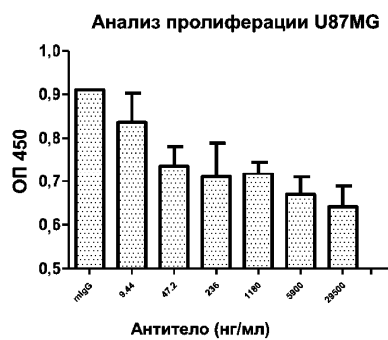
26. Применение по п.24, где рак, экспрессирующий PD-L1, выбран из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легкого, меланомы и рака почки.



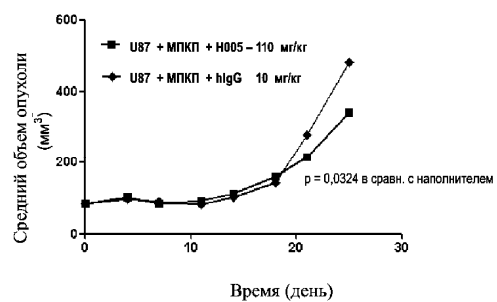
Фиг. 1



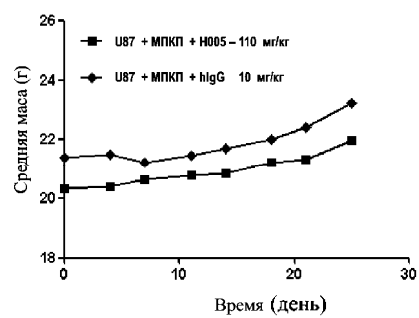
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

