

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036779**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.21

(21) Номер заявки
201792584

(22) Дата подачи заявки
2015.10.13

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

(54) МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО К PD-1 И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(31) **201510312910.8**

(32) **2015.06.09**

(33) **CN**

(43) **2018.07.31**

(86) **PCT/CN2015/091842**

(87) **WO 2016/197497 2016.12.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЕЙДЖИН ДУНФАН БИОТЕК КО.,
ЛТД.; БЕЙДЖИН ЦЗИНИТАЙСЯН
ТЕКНОЛОДЖИ ДЕВЕЛОПМЕНТ
КО., ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:
**Чжоу Хайпин, Ли Сиоаминь, Чжоу
Цзюньцзе, Пэй Шуан, Цзань Яньлу,
Бай И, Бай Сяньхун (CN)**

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) **CN-A-105061597
CN-A-104479020
CN-A-102892785
WO-A1-2006121168
WO-A1-2006121168**

**PATNAIK, A. et al., "Phase I Study of
Pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 Monoclonal
Antibody) in Patients with Advanced Solid Tumors",
CLIN CANCER RES, volume 21, number 19, 14 May
2015 (14.05.2015), see abstract, tables 1-3, and figures
1-4**

(57) Изобретение относится к области техники, предусматривающей разработку антител. Представлено полноразмерное моноклональное антитело к PD-1 человека, способ его получения и варианты его применения. Моноклональные антитела к PD-1 получают с использованием библиотеки полностью синтетических антител с помощью скрининга, а затем антитела, полученные с использованием библиотеки мутантных конструкций области CDR1-3 легкой цепи и области CDR1-3 тяжелой цепи, последовательно подвергают скринингу с помощью технологии созревания аффинности с получением высокоаффинного антитела к PD-1. Антитело можно использовать для лечения опухолей, воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

B1**036779****036779****B1**

Область техники изобретения

Настоящее изобретение относится к антителу, способу его получения и применению. В частности, настоящее изобретение относится к моноклональным антителам к PD-1 человека, полинуклеотидным последовательностям или комбинации полинуклеотидных последовательностей, векторам, клеткам-хозяевам и лекарственным средствам, способу их получения и применению.

Предпосылки изобретения

Иммунная регуляция играет важную роль в ходе осуществления иммунной реакции человеческого организма, а активация иммунокомпетентных клеток является определяющей для регуляции иммунной реакции. Исследователи обнаружили, что активация и пролиферация Т-клеток зависит от двойных сигнальных путей. Концепция "костимулирующих сигналов" была предложена Bretscher и Cohn в 1970 г. на основе модели двойной передачи сигнала при активации Т-клеток, то есть для активации Т-клеток требуется не только доставка комплексов антигенных пептидов с МНС с помощью APC к антигенспецифичным Т-клеткам для образования первых сигналов, но также участие нескольких костимулирующих молекул при образовании дополнительных вторичных сигналов (костимулирующих сигналов); по мере развития исследований, костимулирующие сигналы постепенно стали одной из актуальных тем в иммунологии; эти костимулирующие сигнальные молекулы включают в себя главным образом суперсемейства CD28/B7 и TNFR/TNF. PD-1/PD-L1, как члены суперсемейства CD28/B7 могут опосредовать отрицательные костимулирующие сигналы. Сигнальный путь PD-1/PD-L1 может эффективно подавлять функцию Т- и В-клеток и пролиферацию Т-клеток, при этом секреция цитокинов IL-2, IL-10 и IFN- γ снижается. Он играет важную роль в иммунной регуляции и имеет основное значение при изучении противоопухолевого иммунитета, аутоиммунитета, трансплантационной иммунологии, астмы, вирусных инфекций и других заболеваний.

PD-1 принадлежит к трансмембранным белкам суперсемейства иммуноглобулинов I типа и имеет молекулярный вес, составляющий приблизительно 50-55 кДа. Изначально он был получен из апоптических гибридом Т-клеток с помощью методик вычитающей гибридизации и назван Programmed Cell Death 1, что ассоциируется с апоптозом. Кодировющим геном PD-1 является PD-CD1, который расположен в хромосоме человека 2q37.3 и на 23% гомологичен гену CTLA4. PD-1 состоит из внутриклеточных, трансмембранных и внеклеточных областей, в которых внеклеточная область содержит IgV-подобный домен варибельной области иммуноглобулина; два тирозиновых остатка на N-конце внутриклеточной области совместно с другими аминокислотными остатками образуют иммунорецепторный тирозиновый ингибиторный мотив (ITIM), который играет роль в антагонизации стимулирующих сигналов антигенных рецепторов с помощью фосфорилирования тирозина, обеспечивая тем самым функцию отрицательной регуляции в ходе осуществления иммунной реакции; молекулы PD-1 способны индуцибельно экспрессироваться на поверхности активированных Т-клеток, В-клеток, NK-клеток, моноцитов и дендритных клеток, а также объединяться со своими лигандами PD-L1 и PD-L2 для подавления активации лимфоцитов, подавляя тем самым иммунную реакцию иммунных клеток.

PD-L1 (CD274 или B7H1) и PD-L2 (CD273 или B7DC) представляют собой два лиганда PD1, и оба гена этих двух лигандов расположены в хромосоме человека 9p24.2 с началом в одном и том же направлении и с промежутком, составляющим приблизительно 42 т.п.н.; они принадлежат к семейству B7 и аналогично другим членам, PD-L1 и PD-L2 состоят из IgV-подобного домена, IgC-подобного домена, трансмембранной области, а также короткого и консервативного цитоплазматического концевой сегмента; по сравнению с PD-L2 цитоплазматический концевой сегмент PD-L1 является более консервативным среди различных видов. PD-L1 индуцибельно экспрессируется в активированных Т-клетках, В-клетках, дендритных клетках, моноцитах и различных типах опухолевых клеток (таких как рак легких, рак печени, рак молочной железы, рак яичников, рак почки, рак головы и шеи, рак пищевода, рак кожи и плоскоклеточная карцинома), в то время как PD-L2 экспрессируется главным образом в активированных макрофагах, дендритных клетках и отдельных опухолевых клетках (таких как лимфома Ходжкина). PD-L1 и PD-1 взаимодействуют на поверхности опухоли, приводя к апоптозу специфичных в отношении опухолевых антигенов Т-клеток, способствуя уходу опухолевых клеток от иммунного надзора. Моноклональные антитела к PD-1 способствуют пролиферации специфичных в отношении опухолевых антигенов Т-клеток с помощью блокады сигнального пути PD-1/PD-L1, участвуя при этом в уничтожении опухолевых клеток, эффективно повышая тем самым иммунотерапевтический эффект и демонстрируя возможность лечения различных типов опухолей.

В настоящее время многие крупные международные фармацевтические компании проводили исследования лекарственных средств на основе моноклональных антител к PD-1 или PD-L1, в которых ингибитор PD-1 Opdivo (ниволумаб), представленный компанией Bristol-Myers Squibb, был одобрен в Японии в июле 2014 г.; ингибитор PD-1 Merck@ был одобрен FDA в сентябре 2014 г. Первым показанием для применения этих двух лекарственных средств является меланома. По мере развития клинических программ каждой компании показание для применения будут распространяться на рак легких, рак молочной железы, рак крови и т.д.

Таблица 1

Антитела к PD-1, проходящие в настоящее время клинические испытания

Название антитела	Компания-разработчик	Клиническое исследование	
		Показание для применения	Стадия
Ниволумаб	Bristol-Myers Squibb (Принстон, Нью-Джерси, США)	Лимфома Ходжкина	I
		Опухоль	II
		Почечно-клеточный рак (RCC)	II
	Ono Pharmaceutical Co., Ltd (Осака, Япония)	Меланома	Зарегистрировано
Пембролизумаб	Merck & Co., Inc. (Вайтхаус-Стейшн, Нью-Джерси, США)	Гепатит С	I
		Рак мочевого пузыря	III
		Немелкоклеточный рак легких (NSCLC)	III
		Солидная опухоль	I
		Рак головы и шеи	II
		Лимфома Ходжкина	I
Пидилизумаб	CureTech (Явне, Израиль)	Меланома	Зарегистрировано
		Фолликулярная лимфома	II
		Метастатический колоректальный рак	II
		Рак поджелудочной железы	II
		Лимфома Ходжкина	II
		Рак предстательной железы	II
		Острая миелоидная лимфома (AML)	II
		Рак печени	I/II
		Гепатит С	I/II
		Множественная миелома	II

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение направлено на обеспечение моноклональных антител к PD-1 человека, способ их получения и применение.

Моноклональное антитело к PD-1 человека PFPD1-1 сначала выбирали из библиотеки синтетических антител. PFPD1-1 анализировали и затем с помощью компьютерного конструирования создавали малообъемную библиотеку мутантов на основе данного антитела. Затем создавали библиотеку мутантов CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, с помощью скрининга отбирали моноклональные антитела с более высокой аффинностью, PFPD1-3 и PFPD1-7. Библиотеку мутантов CDR1, CDR 2 и CDR 3 тяжелой цепи создавали на основе PFPD1-1, PFPD1-3 и PFPD1-7, отбирали моноклональные антитела к PD-1 с более высокой аффинностью.

Для достижения вышеупомянутых целей в настоящем изобретении представлен способ получения моноклональных антител к PD-1, который предусматривает:

(1): биопэннинг одноцепочечного антитела к PD-1. Высокоаффинное антитело PFPD1-1 получали из фаговой библиотеки полностью синтетического ScFv в течение трех циклов обогащения и скрининга. Его тяжелая цепь представляет собой PFPD1-H1 (SEQ ID NO: 1) и его легкая цепь представляет собой PFPD1-L1(SEQ ID NO: 5);

(2): на основании PFPD1-1 создавали библиотеку мутантов CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи с помощью анализа третичной структуры PFPD1-1 с использованием компьютерного конструирования. Создавали, подвергали биопэннингу и скринингу библиотеку мутантов CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи. С помощью выявления положительных клонов и сравнения аффинности одноцепочечных антител на уровне фагов получали шесть различных легких цепей антител (PFPD1-2, PFPD1-3, PFPD1-4, PFPD1-5, PFPD1-6 и PFPD1-7), а их соответствующие последовательности легкой цепи представляли собой

PFPD1-L2 (SEQ ID NO: 6), PFPD1-L3 (SEQ ID NO: 7), PFPD1-L4 (SEQ ID NO: 8), PFPD1-L5 (SEQ ID NO: 9), PFPD1-L6 (SEQ ID NO: 10), PFPD1-L7 (SEQ ID NO: 11);

(3): на основании двух клонов DFPD1-3 и PFPD1-7 с более высокой аффинностью создавали, подвергали биоэнингу и скринингу библиотеку мутантов CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, отбирали пять различных одноцепочечных антител (клоны № PFPD1-9, PFPD1-10, PFPD1-11, PFPD1-12 и PFPD1-13). При этом последовательность вариабельной области легкой цепи PFPD1-9, PFPD1-11 и PFPD1-12 представляет собой PFPD1-L3, а последовательность вариабельной области легкой цепи PFPD1-10 и PFPD1-13 представляет собой PFPD1-L7. Последовательность вариабельной области тяжелой цепи PFPD1-9 и PFPD1-10 представляет собой PFPD1-H2 (SEQ ID NO: 2), последовательность вариабельной области тяжелой цепи PFPD1-11 и PFPD1-13 представляет собой PFPD1-H3 (SEQ ID NO: 3), последовательность вариабельной области тяжелой цепи PFPD1-12 представляет собой PFPD1-H4 (SEQ ID NO: 4);

(4): гены, которые кодируют вариабельную область тяжелой цепи и легкой цепи моноклональных антител, были описаны на стадии 3. Соответствующие гены константных областей клонировали в эукариотический вектор экспрессии и трансфицировали в клетки-хозяева. Моноклональные антитела очищали, затем сравнивали аффинность и другие биологические функции целых моноклональных антител.

Моноклональные антитела к PD-1 получали вышеупомянутым способом, в том числе легкую цепь и тяжелую цепь, при этом CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи обозначены LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем LCDR1 представляет собой предпочтительно

RASQNIHSYLD (SEQ ID NO: 18), RASQNVSNWLD (SEQ ID NO: 19), RASQSIHNYLD (SEQ ID NO: 20), RASQDINNWLD (SEQ ID NO: 21), RASQDVRTYLD (SEQ ID NO: 22), RASQGINSWLD (SEQ ID NO: 23) или RASQSVSNYLD (SEQ ID NO: 24),

LCDR2 представляет собой предпочтительно

EASTRAS (SEQ ID NO: 25), DASNRAT (SEQ ID NO: 26), NASTRAT (SEQ ID NO: 27), DASTLAT (SEQ ID NO: 28), GASTRAT (SEQ ID NO: 29) или DASTRAT (SEQ ID NO: 30),

LCDR3 представляет собой предпочтительно

QQALKLPIT (SEQ ID NO: 31), QQSRHIPLT (SEQ ID NO: 32), QQELHLPLT (SEQ ID NO: 33), QQNVNLPLT (SEQ ID NO: 34), QQDIDLPLT (SEQ ID NO: 35), QQSYRLPLT (SEQ ID NO: 36) или QQNMQLPLT (SEQ ID NO: 37).

При этом аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи представляет собой предпочтительно SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

Моноклональные антитела к PD-1 получали вышеупомянутым способом, в том числе легкую цепь и тяжелую цепь, при этом CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи представлены HCDR1, HCDR2 и HCDR3, причем HCDR1 представляет собой предпочтительно

SNNGMH (SEQ ID NO: 38) или SNYGMH (SEQ ID NO: 39),

HCDR2 представляет собой предпочтительно

VIWYDGSKK (SEQ ID NO: 40), VIWYDSSRK (SEQ ID NO: 41) или VIWYDSTKK (SEQ ID NO: 42),

HCDR3 представляет собой предпочтительно TAVYYCATNNDYW (SEQ ID NO: 43) или TAVYYCATNTDYW (SEQ ID NO: 44).

При этом аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи представляет собой предпочтительно SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

В настоящем изобретении также представлены антитела, полипептиды или белки, которые содержат указанные легкую цепь или тяжелую цепи.

В настоящем изобретении также представлены антитела, которые содержат указанные легкую цепь или тяжелую цепи. Указанные антитела способны блокировать связывания PD-1 со своим лигандом PD-L1, в результате чего подавляется биологическая активность PD-1.

В настоящем изобретении также представлены полинуклеотидные последовательности или комбинации, которые кодируют указанные легкую цепь или тяжелую цепи.

В настоящем изобретении также представлены векторы экспрессии рекомбинантной ДНК, которые содержат последовательности ДНК, кодирующие вариабельные области и/или константные области тяжелой цепи и легкой цепи антитела к PD-1.

В настоящем изобретении также представлены клетки-хозяева, трансфицированные указанными векторами экспрессии рекомбинантной ДНК, при этом клетками-хозяевами являются предпочтительно

E. coli и другие прокариотические клетки, клетки дрожжей, насекомых или млекопитающих.

Предпочтительно клетками-хозяевами являются клетки HEK293E, клетки CHO или клетки NS0 и т. д.

В настоящем изобретении также представлены целые антитела, однодоменные антитела, биспецифичные антитела, конъюгаты антител с лекарственными средствами и/или иммунотерапия с использованием Т-клеток с химерными антигенными рецепторами, которые содержат указанные последовательности.

В настоящем изобретении также представлены моноклональные антитела, искусственные векторы, лекарственное средство или комбинации лекарственных средств, которые содержат указанные легкую цепь или тяжелую цепь.

В настоящем изобретении также представлены реагенты для выявления или наборы, которые содержат указанные легкую цепь или тяжелую цепь.

При этом моноклональное антитело к PD-1 содержит целое антитело и его фрагменты, причем фрагменты включают без ограничения Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или ScFv.

При этом полноразмерные антитела представляют собой человеческие моноклональные антитела.

При этом константная область тяжелой цепи моноклонального антитела к PD-1 представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, причем константная область легкой цепи представляет собой C_κ или C_λ.

Предпочтительно константная область тяжелой цепи представляет собой IgG4. Предпочтительно константная область легкой цепи представляет собой C_κ.

CDR представляет собой сокращенное наименование области, определяющей комплементарность, ScFv представляет собой сокращенное наименование одноцепочечного вариабельного фрагмента, CAR-T представляет собой сокращенное наименование иммунотерапии с использованием Т-клеток с химерными антигенными рецепторами, Fab представляет собой сокращенное наименование антиген-связывающего фрагмента, клетка HEK293E представляет собой клетку 293E почки эмбриона человека, клетка CHO представляет собой клетку яичника китайского хомячка, клетка NS0 представляет собой клетку NS0 тимомы мыши.

По сравнению с предыдущим уровнем техники благоприятные эффекты настоящего изобретения способны предотвращать и лечить заболевания с помощью подавления активности PD-1, где заболевания выбраны из группы, состоящей из рака, инфекционных заболеваний или нарушений иммунной системы. Типы рака включают без ограничения рак легких, рак почки, меланому, рак молочной железы, рак печени, рак головы и шеи, рак кожи, плоскоклеточную карциному, рак яичников, рак костей, колоректальный рак, рак мочевого пузыря, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, лимфому Ходжкина, фолликулярную лимфому, хронический или острый лейкоз или солидные опухоли. Инфекционные заболевания включают без ограничения инфекцию ВИЧ, инфекцию вируса гепатита (типа А, В и С), инфекцию вируса герпеса или инфекцию вируса гриппа. Нарушения иммунной системы включают без ограничения эритематозную волчанку, ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, миастению, рассеянный склероз, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, склеродермию, полиартрит или гранулематоз Вегенера.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показана карта плазмиды pScFvDisb-s.

На фиг. 2 показана электрофореграмма ПЦР-продуктов для тяжелой цепи и линкерной области с использованием PFPD1-1 в качестве матрицы для создания библиотеки мутантов вариабельной области легкой цепи.

На фиг. 3 показана электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученная с использованием библиотеки синтетических мутантов легкой цепи в качестве матрицы для создания библиотеки мутантов вариабельной области легкой цепи.

На фиг. 4 показана электрофореграмма ПЦР-продуктов для создания библиотеки мутантов вариабельной области легкой цепи VLCDR123M-PFPD1-1.

На фиг. 5 показана электрофореграмма продуктов двойного расщепления плазмиды pScFvDisb-s с помощью NcoI-HF и NotI для создания библиотеки мутантов вариабельной области легкой цепи и библиотеки вариабельной области тяжелой цепи.

На фиг. 6 показано определение относительной аффинности фаговых Ab, выбранных из библиотеки мутантов вариабельной области легкой цепи, с помощью ELISA в отношении моноклональных фагов.

На фиг. 7 показано определение относительной аффинности фаговых Ab, выбранных из библиотеки мутантов вариабельной области легкой цепи, с помощью ELISA с градиентным разбавлением в отношении фагов.

На фиг. 8 показана электрофореграмма ПЦР-продуктов с использованием библиотеки синтетических мутантов тяжелой цепи в качестве матрицы для создания библиотеки мутантов вариабельной области тяжелой цепи.

На фиг. 9 показана электрофореграмма ПЦР-продуктов для легкой цепи и линкера с использованием плазмид PFPD1-3 и PFPD1-7 в качестве матрицы для создания библиотеки мутантов вариабельной

области тяжелой цепи.

На фиг. 10 показана электрофореграмма ПЦР-продуктов для создания библиотеки мутантов вариабельной области тяжелой цепи VHCDR123M-PFPD1-3.

На фиг. 11 показана электрофореграмма ПЦР-продуктов с использованием библиотеки мутантов, полученной с помощью амплификации, для создания библиотеки мутантов вариабельной области тяжелой цепи VHCDR123M-PFPD1-7.

На фиг. 12 показано определение относительной аффинности фаговых Ab, выбранных из библиотеки мутантов вариабельной области тяжелой цепи, с помощью ELISA в отношении моноклональных фагов.

На фиг. 13 показано определение относительной аффинности фаговых Ab, выбранных из библиотеки мутантов вариабельной области тяжелой цепи, с помощью ELISA с градиентным разбавлением в отношении фагов.

На фиг. 14 показана карта плазмидного вектора pTSE.

На фиг. 15 показаны значения активности связывания моноклональных антител с PD-1 в виде свободного белка.

На фиг. 16 показано конкурентное ингибирование связывания PD-1 с PD-L1 с помощью полноразмерных антител.

На фиг. 17 показаны значения активности связывания моноклональных антител с PD-1 на клеточной поверхности.

Подробное описание иллюстративных вариантов осуществления

Вариант осуществления настоящего изобретения описан в следующих примерах. Однако необходимо отметить, что вариант осуществления не ограничен определенными подробностями этих примеров.

Все экспериментальные способы, описанные в следующих примерах, представляют собой общепринятые технологии, если не указано иное; все описанные реагенты и биологические средства являются коммерчески доступными, если не указано иное.

В настоящем изобретении представлено моноклональное антитело, которое специфически взаимодействует с PD-1, при этом вариабельная область тяжелой цепи выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, вариабельная область легкой цепи выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

Предпочтительно последовательность вариабельной области тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, последовательность вариабельной области легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 11.

В ходе скрининга фаговой библиотеки легкой цепи аминокислотная последовательность LCDR1, LCDR2 или LCDR3 легкой цепи или ее функциональный фрагмент моноклонального антитела выбраны из следующей группы (как показано в табл. 1).

Таблица 1

Аминокислотная последовательность каждой CDR в легкой цепи			
№	LCDR1	LCDR2	LCDR3
A	RASQNIHSYLD (SEQ ID NO: 18)	EASTRAS (SEQ ID NO: 25)	QQALKLPIT (SEQ ID NO: 31)
B	RASQNVSNWLD (SEQ ID NO: 19)	DASNRAT (SEQ ID NO: 26)	QQSRHIPLT (SEQ ID NO: 32)
C	RASQSIHNYLD (SEQ ID NO: 20)	NASTRAT (SEQ ID NO: 27)	QQELHLPLT (SEQ ID NO: 33)
D	RASQDINNWLD (SEQ ID NO: 21)	DASTLAT (SEQ ID NO: 28)	QQNVNLPLT (SEQ ID NO: 34)
E	RASQDVRTYLD (SEQ ID NO: 22)	GASTRAT (SEQ ID NO: 29)	QQDIDLPLT (SEQ ID NO: 35)
F	RASQGINSWLD (SEQ ID NO: 23)	DASTRAT (SEQ ID NO: 30)	QQSYRLPLT (SEQ ID NO: 36)
G	RASQSVSNYLD (SEQ ID NO: 24)	DASTRAT (SEQ ID NO: 30)	QQNMQLPLT (SEQ ID NO: 37)

В ходе скрининга фаговой библиотеки тяжелой цепи, CDR1, CDR2 или CDR3 тяжелой цепи или ее функциональный фрагмент моноклональных антител представлены HCDR1, HCDR2 или HCDR3, при этом HCDR1 содержит

SNNGMH (SEQ ID NO: 38) или SNYGMH (SEQ ID NO: 39), HCDR2 содержит VIWYDGSKK (SEQ ID NO: 40), VIWYDSSRK (SEQ ID NO: 41) или VIWYDSTKK (SEQ ID NO: 42), HCDR3 содержит TAVYYCATNNDYW (SEQ ID NO: 43) или TAVYYCATNTDYW (SEQ ID NO: 44).

Предпочтительно в ходе скрининга фаговой библиотеки тяжелой цепи переменная область тяжелой цепи моноклонального антитела, специфически взаимодействующая с PD-1, содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, а переменная область легкой цепи содержит последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3. При этом последовательность HCDR1 переменной области тяжелой цепи выбрана из аминокислотной последовательности SNNGMH (SEQ ID NO: 38) или SNYGMH (SEQ ID NO: 39), последовательность LCDR1 переменной области легкой цепи выбрана из аминокислотной последовательности RASQSIHNYLD (SEQ ID NO: 20) или RASQSVSNYLD (SEQ ID NO: 24), последовательность HCDR2 переменной области тяжелой цепи выбрана из аминокислотной последовательности VIWYDGSKK (SEQ ID NO: 40) или VIWYDSSRK (SEQ ID NO: 41), последовательность LCDR2 переменной области легкой цепи выбрана из аминокислотной последовательности NASTRAT (SEQ ID NO: 27) или DASTRAT (SEQ ID NO: 30), последовательность HCDR3 переменной области тяжелой цепи выбрана из аминокислотной последовательности TAVYYCATNNDYW (SEQ ID NO: 43) или TAVYYCATNTDYW (SEQ ID NO: 44), последовательность LCDR3 переменной области легкой цепи выбрана из аминокислотной последовательности QQELHLPLT (SEQ ID NO: 33) или QQNMQLPLT (SEQ ID NO: 37).

В соответствии с настоящим изобретением антитело, которое специфически взаимодействует с PD-1, получают из фаговой библиотеки синтетического ScFv, при этом способ получения моноклональных антител к PD-1 предусматривает следующее.

Прежде всего, библиотеку одноцепочечных антител к PD-1 подвергали биоэниннгу посредством трех циклов обогащения и скрининга библиотеки антител и получали высокоаффинное антитело PFPD1-1.

Во-вторых, разрабатывали библиотеку мутантов CDR1, CDR2 или CDR3 легкой цепи с помощью компьютерного конструирования на основе PFPD1-1. Шесть различных легких цепей антител (PFPD1-2, PFPD1-3, PFPD1-4, PFPD1-5, PFPD1-6 или PFPD1-7) выявляли в качестве положительных клонов с помощью биоэниннга и сравнения аффинностей ScFv на уровне фага.

В-третьих, библиотеку мутантов CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи создавали на основе двух штаммов клонов PFPD1-3 и PFPD1-7 с более высокой аффинностью. Пять различных одноцепочечных антител, которые представляют собой PFPD1-9, PFPD1-10, PFPD1-11, PFPD1-12, PFPD1-13, отбирали с помощью биоэниннга и сравнения аффинностей ScFv на уровне фага.

В конечном итоге, гены варибельной области тяжелой цепи и легкой цепи моноклонального антитела, которые описаны выше, и соответствующие гены константных областей клонировали в эукариотический вектор экспрессии и трансфицировали в клетки-хозяева, получали моноклональное антитело и затем сравнивали его аффинность и другие биологические функции.

Пример 1. Биоэниннг библиотеки одноцепочечных антител к PD-1.

Вектор pComb3 (приобретенный в Biovector Science Lab, Inc.) модифицировали с помощью ряда технологий клонирования для разработки и экспрессии фаговой библиотеки одноцепочечных антител. Модифицированный вектор назвали pScFvDisb-s, как показано на фиг. 1, и использовали для получения библиотеки полностью синтетических фаговых антител.

Пробирки для иммунных анализов покрывали антигеном PD-1-His, при этом содержание покрывающего антигена составляло 5 мкг/500 мкл/пробирка, и оставляли при температуре 4°C в течение ночи. 4% обезжиренное молоко/PBST использовали с целью блокирования пробирок для иммунного анализа, и библиотеку полностью синтетических фаговых антител оставляли при комнатной температуре в течение 1 ч. Библиотеку заблокированных фаговых антител добавляли в пробирку для иммунного анализа с целью взаимодействий Ab-Ag при комнатной температуре в течение 1 ч, при этом количество входящих фагов составляло приблизительно 10^9 - 10^{12} . Для промывания несвязанных фагов использовали PBST-PBS, для элюирования использовали 0,1 М глицин-HCl (pH 2,2), для нейтрализации элюированного раствора фаговых антител до приблизительно pH 7,0 использовали 1,5 М Трис-HCl (pH 8,8).

Выращивали до логарифмического периода 10 мл бактерий TG1, инфицированных вышеупомянутыми нейтрализованными фагами, и оставляли на 30 мин при температуре 37°C в инкубаторе. Часть культуры бактерий использовали для градиентного разбавления, нанося на планшет 2YTAG с целью расчета количества выходящих фагов. Оставшиеся бактерии центрифугировали, затем снимали супернатант. Талломный осадок суспендировали в небольшом количестве жидкой среды для культивирования, которую использовали для нанесения на большой планшет 2YTAG для следующего цикла скрининга.

Таллом счищали с большого планшета, инокулировали в жидкую среду для культивирования 2YTAG, добавляя M13K07 для суперинфекции хелперных фагов после встряхивания до логарифмического периода, культивируя при температуре 28°C в течение ночи с амплификацией фагов, с целью осаждения и очистки фага для следующего цикла скрининга использовали PEG/NaCl. В целом выполняли три цикла обогащения и скрининга фаговой библиотеки.

Пример 2. Скрининг положительных клонов для одноцепочечного фагового антитела к PD-1.

После трех циклов скрининга моноклональные бактериальные колонии отбирали для инокуляции в 96-луночные планшеты с глубокими лунками, содержащими жидкую среду для культивирования 2YTAG, и культивировали при температуре 37°C при 220 об/мин до периода логарифмического роста, затем в каждую лунку на 30 мин при температуре 37°C с целью инфицирования добавляли приблизительно 10 хелперного фага M13K07. Затем культуру центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин, супернатант удаляли, таллом суспендировали с помощью 2YТАКА. После культивирования при 220 об/мин при температуре 28°C в течение ночи культуру центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин при температуре 4°C, затем фаговый супернатант отбирали для ELISA. С помощью скрининга получали одноцепочечное антитело PFPD1-1 с более высокой аффинностью, варибельную область тяжелой цепи называли PFPD1-H1, которая имела аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1, варибельную область легкой цепи называли PFPD1-L1, которая имела аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 5.

Пример 3. Исследование созревания аффинности *in vitro* одноцепочечного антитела к PD-1 PFPD1-1.

1. Создание библиотеки мутантов для CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи PFPD1-1.

Праймеры PVLFI и PVLRI разрабатывали с использованием ДНК, имеющей последовательность нуклеиновой кислоты, показанную под SEQ ID NO: 12 в качестве матрицы, библиотеку генов легкой цепи (как показано на фиг. 3) амплифицировали с помощью ПЦР; праймеры PVHF1 и PVHR1, плазмиду PFPD1-1 в качестве матрицы использовали для амплификации ее тяжелой цепи и ее линкера (как показано на фиг. 2). Условие реакции: 95°C в течение 30 с, 1 цикл, 95°C в течение 15 с, 60°C в течение 10 с, 72°C в течение 30 с, 3 цикла, 95°C в течение 15 с, 72°C в течение 40 с, 25 циклов, 72°C в течение 5 мин,

хранение при температуре 4°C. Продукты ПЦР извлекали с помощью универсального набора для извлечения.

Последовательности праймеров были следующими:

PVLF1 : 5'-GATATCCAGATGACCCAGAGC -3' (SEQ ID NO: 45)

PVLR1 : 5'-CTAAGCGGCCGCTTTGATCTCCACTTTGGTGC-3' (SEQ ID NO: 46)

PVHF1 : 5'-CATACCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG-3' (SEQ ID NO: 47)

PVHR1 : 5'-GCTCTGGGTCATCTGGATATCGGATCCACCACC-3' (SEQ ID NO: 48)

Библиотеку мутантов варибельной области легкой цепи PFPD1-1 получали с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами посредством амплификации двух вышеупомянутых продуктов ПЦР. Условие реакции: 95°C в течение 30 с, 1 цикл, 95°C в течение 15 с, 72°C в течение 30 с, 4 цикла (добавленные праймеры PVHF1 и PVLR1), 95°C в течение 15 с, 72°C в течение 40 с, 25 циклов, 72°C в течение 5 мин, хранение при температуре 4°C. Продукты ПЦР извлекали с помощью универсального набора для извлечения, соответствующий продукт ПЦР называли VLCDR123M-PFPD1-1 (как показано на фиг. 4).

Плазмиду pScFvDisb-s и VLCDR123M-PFPD1-1 расщепляли с помощью NcoI-HF и NotI, и расщепленные ферментами продукты подвергали электрофорезу на 0,8% агарозном геле (как показано на фиг. 5). После экстракции геля ДНК очищали с использованием коммерчески доступного набора для очистки ДНК. Очищенные расщепленные VLCDR123M-PFPD1-1 и pScFvDisb-s лигировали при молярном соотношении 4:1 с помощью ДНК-лигазы T4 в течение 4 ч при температуре 16°C. Продукт лигирования трансформировали в TG1-компетентные клетки с помощью электропорации. После извлечения клеток через 1 ч при температуре 37°C в среде SOC часть бактерий помещали в чашку для культивирования с целью оценки емкости библиотеки. Оставшуюся культуру бактерий центрифугировали при комнатной температуре при 4000 об/мин в течение 15 мин и супернатант удаляли. Осадок помещали на большой планшет 2YTAG и культивировали при температуре 37°C в течение ночи.

Емкость библиотеки антител составляла приблизительно 10^8 . Для секвенирования из библиотеки антител случайным образом извлекали двадцать клонов, при этом последовательности характеризовались 95% точностью, а емкость библиотеки антител характеризовалась высоким разнообразием.

2. Биопаннинг библиотеки фаговых антител и скрининг положительных клонов.

Скрининг проводили в соответствии со способом из примера 1, все клоны, которые характеризовались высокой аффинностью, секвенировали, затем получали шесть различных клонов и называли их соответственно PFPD1-2, PFPD1-3, PFPD1-4, PFPD1-5, PFPD1-6 и PFPD1-7, соответствующую варибельную область легкой цепи называли PFPD1-L2, PFPD1-L3, PFPD1-L4, PFPD1-L5, PFPD1-L6 и PFPD1-L7, соответствующая аминокислотная последовательность показана соответственно в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11. Относительную аффинность моноклонального фага определяли с помощью ELISA, как показано на фиг. 6.

3. Определение аффинности ScFv антитела к PD-1 с помощью ELISA фагов с градиентным разбавлением.

Выявление и очистку фага клонов, полученных в примере 2, аффинность фаговых Ab определяли с помощью исследования ELISA фагов с градиентным разбавлением.

Для покрытия при температуре 4°C в течение ночи использовали PD1-His в карбонатном буферном растворе со значением pH 9,6. Для промывки использовали три раза PBST, для блокирования при температуре 37°C в течение 1 ч использовали 4% обезжиренное молоко-PBST. Очищенные фаги разбавляли три раза с помощью 4% молока-PBST, затем в каждую лунку добавляли разбавленный 100 мкл образец. После пребывания при комнатной температуре в течение 1 ч планшет для ELISA промывали PBST, затем в планшет для ELISA добавляли моноклональное антитело к M13-HRP, разбавленное в 4% обезжиренном молоке. После пребывания при комнатной температуре в течение 1 ч лунки окрашивали с помощью набора с раствором красителя TMB и оставляли на 5 мин при комнатной температуре. Реакцию завершали добавлением 50 мкл 2 моль/л H_2SO_4 на лунку, и оптическую плотность измеряли с помощью микропланшетного ридера при длине волны 450 и 630 нм. Результаты показали, что несколько различных выбранных фаговых антител можно объединять с PD-1, также аффинность PFPD1-3 и PFPD1-7 была значительно выше, чем у других клонов (как показано на фиг. 7). Для дальнейших экспериментов выбирали PFPD1-3 и PFPD1-7.

Пример 4. Исследование аффинности созревания *in vitro* одноцепочечных антител к PD-1 PFPD1-3 и PFPD1-7.

1. Разработки библиотеки мутантов CDR1, CDR 2 и CDR 3 тяжелой цепи для PFPD1-3 и PFPD1-7.

С использованием библиотеки мутантов синтезированной тяжелой цепи (как показано в SEQ ID NO: 13) в качестве матрицы, а также PVHF2 и PVHR2 в качестве праймеров ПЦР, библиотеку генов тя-

желой цепи (как показано на фиг. 8) амплифицировали с помощью ПЦР; PVLF2 и PVLR2 в качестве праймеров, а также плазмиды PFPD1-3 и PFPD1-7, использовали в качестве матрицы для амплификации ее тяжелой цепи и ее линкера (как показано на фиг. 9). При этом слева расположена PFPD1-3, справа расположена PFPD1-7. Условия реакции: 95°C в течение 30 с, 1 цикл, 95°C в течение 15 с, 60°C в течение 10 с, 72°C в течение 30 с, 3 цикла, 95°C в течение 15 с, 72°C в течение 40 с, 25 циклов, 72°C в течение 5 мин, хранение при температуре 4°C. Продукты ПЦР извлекали с помощью универсального набора для извлечения.

Последовательности праймеров были следующими:

PVHF2 : '5CATACCATGGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG3' (SEQ ID NO: 49)

PVHR2 : '5TGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCCCTG 3' (SEQ ID NO: 50)

PVLF2 : '5 CTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGTGGTGGTAGC3' (SEQ ID NO: 51)

PVLR2 : '5 CTAAGCGGCCGCTTTGATCTCCACTTTGGTGC3' (SEQ ID NO: 52)

Два вышеупомянутых продукта ПЦР амплифицировали с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами с получением гена библиотеки мутантов тяжелой цепи PFPD1-3 и PFPD1-7. Условия реакции: 95°C в течение 30 с, 1 цикл, 95°C в течение 15 с, 72°C в течение 30 с, 4 цикла (добавлены праймеры PVHF2 и PVLR2), 95°C в течение 15 с, 72°C в течение 40 с, 25 циклов, 72°C в течение 5 мин, хранение при температуре 4°C. Продукты ПЦР извлекали с помощью универсального набора для извлечения, соответствующие продукты называли VHCDR123M-PFPD1-3 (как показано на фиг. 10) и VHCDR123M-PFPD1-7 (как показано на фиг. 11).

VHCDR123M-PFPD1-3, VHCDR123M-PFPD1-7 и плазмиду pScFvDisb-s расщепляли с помощью NcoI-HF и NotI, и расщепленные ферментами продукты разделяли с помощью электрофореза в 0,8% агарозном геле (как показано на фиг. 5). После гель-экстракции расщепленные ферментами продукты очищали с помощью коммерчески доступного набора для очистки ДНК. Расщепленные продукты ПЦР и pScFvDisb-s лигировали при молярном соотношении 4:1 с помощью ДНК-лигазы T4 в течение 4 ч при температуре 16°C. Продукты лигирования трансформировали в TG1-компетентные клетки с помощью электропорации. После извлечения клеток в среде SOC при температуре 37°C в течение 1 ч небольшую часть бактерий помещали в чашку для культивирования с целью оценки емкости библиотеки антител. Оставшиеся бактерии центрифугировали при комнатной температуре при 4000 об/мин в течение 15 мин и супернатант удаляли. Осадок помещали на большой планшет 2YTAG для культивирования и культивировали при температуре 37°C в течение ночи.

Получали две разные библиотеки антител; емкость каждой библиотеки антител составляла приблизительно 10^7 , емкость библиотеки антител была гораздо выше разнообразия. Двадцать клонов из вышеупомянутой библиотеки антител случайным образом секвенировали, при этом последовательности характеризовались 90% точностью.

2. Биопэннинг библиотеки фаговых антител и скрининг положительных клонов.

Две вышеупомянутые библиотеки антител подвергали выявлению, осаждали и очищали на уровне фага. Затем антитела к PD-1 в форме ScFv из этих библиотек подвергали биопэннингу. Способ биопэннинга библиотек фаговых антител был таким же, как в примере 1. Способ скрининга положительных клонов ScFv антител к PD-1 был таким же, как в примере 2. В результате пять различных антител к PD-1 подвергали скринингу. Их называли PFPD1-9, PFPD1-10, PFPD1-11, PFPD1-12, PFPD1-13. При этом последовательность варибельной области легкой цепи PFPD1-9, PFPD1-11 и PFPD1-12 представляла собой PFPD1-L3; и последовательность варибельной области легкой цепи PFPD1-10 и PFPD1-13 представляла собой PFPD1-L7; и последовательность варибельной области тяжелой цепи PFPD1-9 и PFPD1-10 представляла собой PFPD1-H2; последовательность варибельной области тяжелой цепи PFPD1-11 и PFPD1-13 представляла собой PFPD1-H3; последовательность варибельной области тяжелой цепи PFPD1-12 представляла собой PFPD1-H4. Относительную аффинность моноклонального фага определяли с помощью ELISA, как показано на фиг. 12.

3. Определение аффинности ScFv антитела к PD-1 с помощью ELISA фагов с градиентным разбавлением.

Выявление и очистку клонов выполняли, как описано во втором варианте осуществления данного примера на уровне моноклонального фага; аффинность фаговых Ab определяли с помощью исследования ELISA с градиентным разбавлением, при этом способ был тем же, как и в третьем варианте осуществления примера 3. В результате было показано, что несколько различных фаговых антител могли взаимодействовать с PD-1. Видимая разница аффинности между этими фаговыми антителами отсутствовала (как показано на фиг. 13), при этом PFPD1-9, PFPD1-10, PFPD1-11, PFPD1-12 и PFPD1-13 были более эффективными и их использовали для дальнейших экспериментов.

Пример 5. Определение аффинности моноклональных антител к PD-1 PFPD1-9, PFPD1-10, PFPD1-11, PFPD1-12 и PFPD1-13. 1. Получение полноразмерного антитела к PD-1.

ДНК, кодирующие вышеупомянутые VH тяжелой цепи и VK легкой цепи антител, клонировали соответственно в вектор pTSE, при этом ДНК кодировали константную область тяжелой цепи, константную область легкой цепи (как показано на фиг. 14), константную область $\gamma 4$ (как показано в SEQ ID NO: 14) и κ (как показано в SEQ ID NO: 17) человека (карта вектора pTSE показана на фиг. 14, способ получения, как показано в описании, с. 3, раздел 0019 CN103525868A). Для экспрессии антител использовали транзигентно трансфицированные клонированным вектором клетки HEK293E. Белки антител очищали с помощью колонки для аффинной хроматографии с белком А с помощью АКТА.

2. Определение аффинности моноклонального антитела с помощью BIAcore X100.

Аффинности антител определяли с помощью способа захвата лигандов. Антитело к IgG человека связывали с поверхностью чипа CM5, а PFPD1-9, PFPD1-10, PFPD1-11, PFPD1-12 и PFPD1-13 соответственно разбавляли для обеспечения захвата приблизительно 300 RU антитела антителом к IgG человека. Несколько градиентов концентраций PD-1 (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125, 3,9063, 1,9531 и 0,9766 нМ) пропускали через поверхность неподвижной фазы для определения аффинностей антител. Результаты показали отсутствие видимой разницы в аффинности антител (как показано в табл. 2).

Таблица 2

Определение констант аффинности для полноразмерного антитела к PD 1

Образец	k_a (1/М·сек)	k_d (1/сек)	KD
DFFPD1-9	1,626E+4	1,045E-4	6,429E-9
DFFPD1-10	3,285E+4	1,300E-4	3,957E-9
DFFPD1-11	9,357E+3	1,015E-4	1,085E-8
DFFPD1-12	1,327E+4	2,975E-4	2,242E-8
DFFPD1-13	1,811E+4	1,079E-4	9,504E-9

3. Анализ связывания антитела к PD-1.

Для покрытия 96-луночного планшета при температуре 4°C в течение ночи использовали PD-1-His в карбонатном буферном растворе с pH 9,6, 60 нг/луночка/100 мкл. После пятикратной промывки с помощью 300 мкл/луночка PBST лунки блокировали на 2 ч с помощью 1% BSA-PBS при температуре 37°C. Добавляли различные разбавления антител PFPD1-9, PFPD1-10, PFPD1-11, PFPD1-12 и PFPD1-13. Наибольшая концентрация этих пяти видов антител составляла 16 мкг/мл, разбавленная 4 раза до 11 градиентов, при этом последнюю лунку использовали в качестве отрицательного контроля, который представлял собой только разбавитель PBS. После инкубирования при температуре 37°C в течение 1 ч лунки промывали пять раз с помощью 300 мкл/луночка PBST, затем добавляли вторичные антитела HRP к Fc человека, разбавленные до 1:40000 1% BSA-PBS, инкубируя при температуре 37°C в течение 1 ч. После окрашивания с помощью набора с раствором красителя TMB, 100 мкл/луночка, в течение 8 мин при комнатной температуре реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2 моль/л H_2SO_4 /луночка и оптическую плотность определяли при длине волны 450 и 630 нм. Результат представлен на фиг. 15, при этом все антитела могли связываться с PD-1.

4. Исследование конкурентного ингибирования антител при связывании PD-L1 с PD-1.

Для покрытия планшетов при температуре 4°C в течение ночи использовали PDL1-Fc в карбонатном буферном растворе с pH 9,6. После пятикратной промывки с помощью PBST, лунки блокировали на 2 ч 1% BSA-PBS при температуре 37°C. Соответственно разбавляли следующие пять антител с 4 мкг/мл PD1-His, PFPD1-9, PFPD1-10, PFPD1-11, PFPD1-12 и PFPD1-13, начиная с молярного соотношения 10:1 антитела и PD1-His, при этом градиентное разбавление проводили пять раз и для каждого образца получали 9 градиентов разбавления. После инкубирования при температуре 37°C в течение 1 ч лунки промывали пять раз с помощью PBST, а затем добавляли антитело мыши к His, меченое HRP, с разбавленным 1% BSA-PBS. После инкубирования при температуре 37°C в течение 1 ч лунки окрашивали с помощью набора с раствором красителя TMB, 100 мкл/луночка, в течение 8 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 10% H_2SO_4 /луночка. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм и 630 нм. Результат показан на фиг. 16, PFPD1-9, PFPD1-10, PFPD1-11, PFPD1-12 и PFPD1-13 могли подавлять связывание PD-1 и PD-L1.

Пример 6. Анализ связывания антитела к PD-1 и PD-1 клеточной поверхности.

Прежде всего, получали линию клеток CHO со стабильной сверхэкспрессией PD-1 и называли ее

PD1-CHO. После покрытия 96-луночных планшетов желатином клетки PD1-CHO расщепляли трипсином и затем процесс останавливали. После центрифугирования и суспендирования клетки разбавляли до 2×10^5 клеток/мл, 100 мкл на лунку, в 96-луночных планшетах, всего 12 лунок $\times$ 6 рядов, а именно 2×10^4 клеток/лунка, и культивировали при 5% CO₂, при температуре 37°C в течение ночи. Среду для культивирования извлекали на следующий день, и лунки промывали один раз 350 мкл предварительно охлажденного PBS. Для фиксации на 5 мин добавляли свежеприготовленную 2% PFA, а затем для промывки два раза использовали PBS.

Полноразмерное антитело к PD-1 при двойном разбавлении добавляли в планшеты с клетками, разбавителем был PBS с 0,5% BSA. Начальная концентрация образцов составляла 100 мкг/мл, затем разбавляли 8 раз, всего было 12 градиентов разбавления. После инкубирования в течение 30 мин при комнатной температуре супернатант удаляли и лунки промывали три раза по 350 мкл предварительно охлажденного PBS. Добавляли вторичные антитела HRP к Fc человека, разбавленные до 1:5000, и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. После трехкратной промывки 350 мкл PBS, в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора красителя TMB, окрашивая от 15 до 30 мин при комнатной температуре. После добавления 50 мкл 2 моль/л H₂SO₄ на лунку с целью прекращения окрашивания оптическую плотность измеряли при длине волны 450 и 630 нм с помощью микропланшетного ридера. Результаты обрабатывали с помощью компьютерной программы Graph pad prism и рассчитывали константу связывания (как показано на фиг. 17).

Настоящее изобретение включает все комбинации упомянутых определенных вариантов осуществления. Дополнительные варианты осуществления и полный объем применения настоящего изобретения будут очевидны из подробного описания, приведенного в данном документе далее. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и указывающие на предпочтительные варианты осуществления, имеют лишь иллюстративный характер, поскольку различные изменения и модификации в сущности и объеме настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники исходя из данного подробного описания. Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в данном документе, в том числе их упоминания, включены с помощью ссылки для всех целей во всей своей полноте.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело к PD-1, характеризующееся тем, что оно содержит легкие цепи и тяжелые цепи, где легкая цепь содержит три области, определяющие комплементарность (CDR), под названием LCDR1, LCDR2 и LCDR3; где тяжелая цепь содержит три области, определяющие комплементарность, под названием HCDR1, HCDR2 и HCDR3;

при этом указанные CDR выбраны из следующих комбинаций:

(DFPD1-9): LCDR1: SEQ ID NO: 20, LCDR2: SEQ ID NO: 27, LCDR3:

SEQ ID NO: 33; HCDR1: SEQ ID NO: 39, HCDR2: SEQ ID NO: 41 и HCDR3:

SEQ ID NO: 43;

(DFPD1-10): LCDR1: SEQ ID NO: 24, LCDR2: SEQ ID NO: 30, LCDR3:

SEQ ID NO: 37; HCDR1: SEQ ID NO: 39, HCDR2: SEQ ID NO: 41 и HCDR3:

SEQ ID NO: 43;

(DFPD1-11): LCDR1: SEQ ID NO: 20, LCDR2: SEQ ID NO: 27, LCDR3:

SEQ ID NO: 33, HCDR1: SEQ ID NO: 38, HCDR2: SEQ ID NO: 41 и HCDR3:

SEQ ID NO: 43;

(DFPD1-12): LCDR1: SEQ ID NO: 20, LCDR2: SEQ ID NO: 27, LCDR3:

SEQ ID NO: 33, HCDR1: SEQ ID NO: 39, HCDR2: SEQ ID NO: 40 и HCDR3:

SEQ ID NO: 43;

(DFPD1-13): LCDR1: SEQ ID NO: 24, LCDR2: SEQ ID NO: 30, LCDR3:

SEQ ID NO: 37, HCDR1: SEQ ID NO: 38, HCDR2: SEQ ID NO: 41 и HCDR3:

SEQ ID NO: 43.

2. Моноклональное антитело к PD-1 по п.1, где легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, которая выбрана из одного из пептидов, имеющих аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

3. Моноклональное антитело к PD-1 по п.1, где тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая выбрана из одного из пептидов, имеющих аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

4. Полинуклеотид, где полинуклеотидная последовательность кодирует моноклональное антитело к PD-1 по п.1.

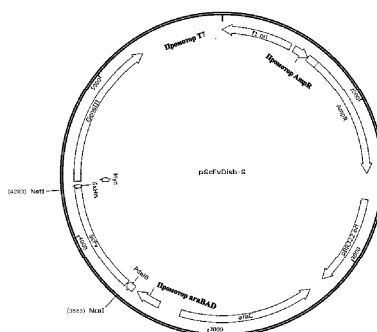
5. Вектор экспрессии рекомбинантной ДНК, где вектор экспрессии рекомбинантной ДНК содержит полинуклеотидную последовательность или комбинацию полинуклеотидных последовательностей, кодирующие моноклональное антитело к PD-1 по п.1.

6. Клетка-хозяин, трансфицированная вектором экспрессии рекомбинантной ДНК по п.5, при этом клетка-хозяин выбрана из прокариотических клеток, клеток дрожжей, насекомых или млекопитающих.

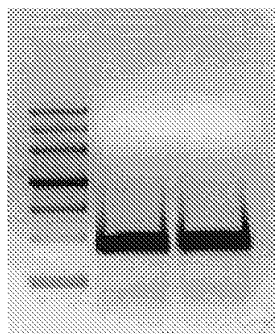
7. Моноклональное антитело к PD-1 по любому из пп.1-3, где моноклональное антитело к PD-1 представляет собой человеческое антитело; при этом тяжелая цепь имеет константную область, выбранную из константной области IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4; легкая цепь имеет константную область, которая представляет собой С_κ или С_λ.

8. Лекарственное средство, содержащее моноклональное антитело к PD-1 по п.1, где лекарственное средство применяют для лечения или предотвращения рака.

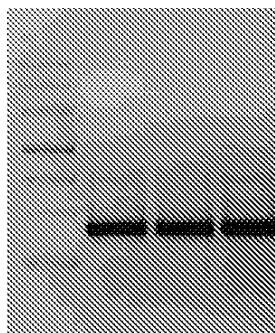
9. Реагент для выявления PD-1, содержащий моноклональное антитело к PD-1 по п.1.



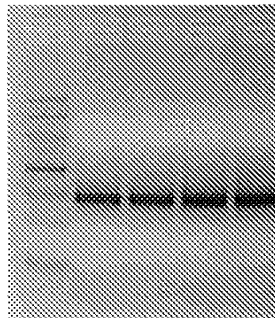
Фиг. 1



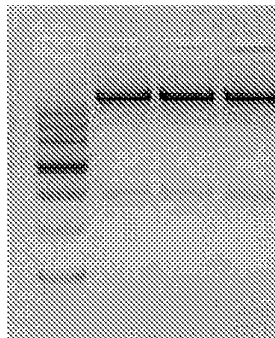
Фиг. 2



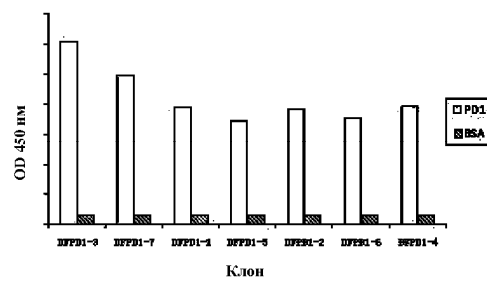
Фиг. 3



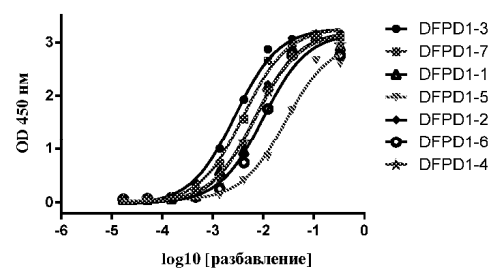
Фиг. 4



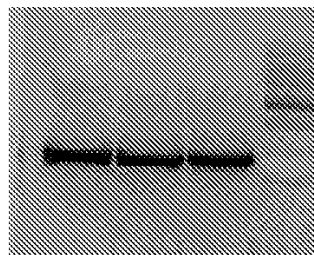
Фиг. 5



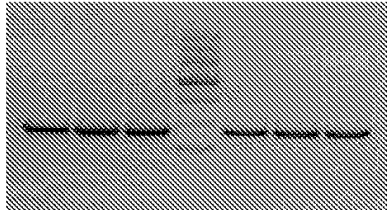
Фиг. 6



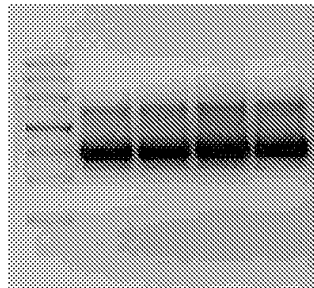
Фиг. 7



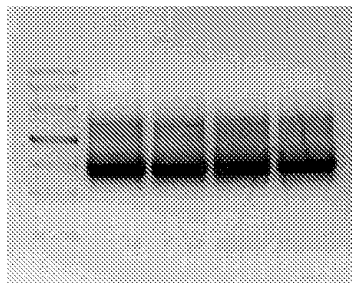
Фиг. 8



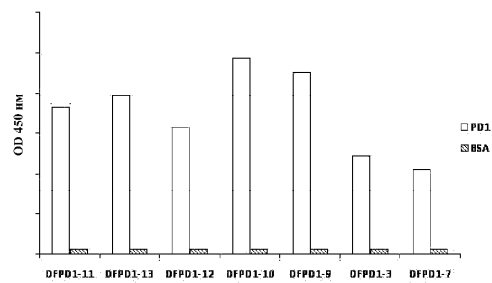
Фиг. 9



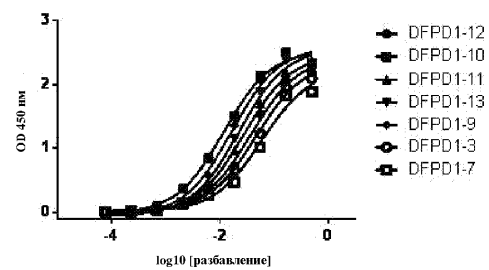
Фиг. 10



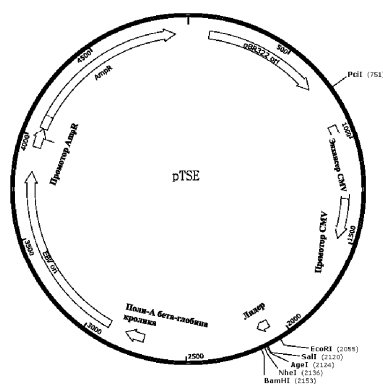
Фиг. 11



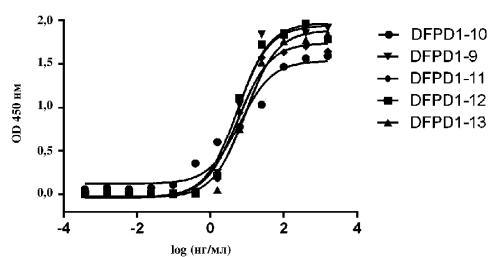
Фиг. 12



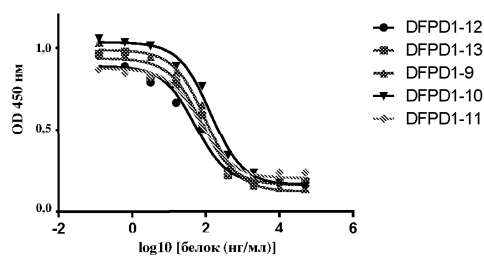
Фиг. 13



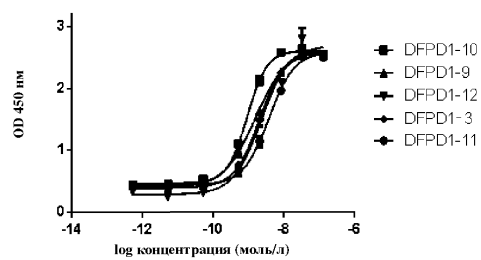
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

