

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091809** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2020.11.23

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

(22) Дата подачи заявки
2019.02.22

(54) **АГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 62/637,643

(32) 2018.03.02

(33) US

(86) PCT/US2019/019076

(87) WO 2019/168745 2019.09.06

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(74) Представитель:

Парамонова К.В., Строкова О.В.,
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатулина
Е.М., Лебедев В.В., Джермакян Р.В.,
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,
Глухарёва А.О., Костюшенкова М.Ю.,
Лыу Т.Н. (RU)

(72) Изобретатель:
Чай Цин, Фэн Ицин, Ньюбёрн
Кристин Пэйдж, Трухлар Стефани
Мари, Вердино Петра, Ячи Пиа
Паулина (US)

(57) Данное изобретение относится к агонистическим антителам против PD-1 человека и их применению для лечения аутоиммунных нарушений, таких как ревматоидный артрит, или для уменьшения отторжения трансплантированных клеток и/или тканей.

202091809
A1

202091809

A1

АГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Данное изобретение относится к области медицины. Более конкретно, данное изобретение относится к агонистическим антителам, направленным на белок 1 запрограммированной гибели клетки человека (PD-1; также известный как CD279), к
5 композициям, содержащим такие агонистические антитела против PD-1 человека, и к способам применения таких агонистических антител против PD-1 человека для лечения аутоиммунных нарушений или отторжения трансплантата.

Пути иммунных контрольных точек модулируют как аутоиммунный ответ, так и противораковый иммунный ответ (Isakov, N., *J. Autoimmune Disorders* 2016; 2(2):17). В
10 терапии аутоиммунных заболеваний является желательным стимулирование, *то есть* агонизация, эффект иммуноингибирующего пути, так что иммунный ответ подавляется. И наоборот, при лечении рака желательно ингибировать, *то есть* антагонизировать, активность иммуноингибирующего пути, так что иммунный ответ подавляется или стимулируется.

PD-1 представляет собой белок клеточной мембраны типа I. PD-1 принадлежит к
15 расширенному семейству CD28/CTLA-4, содержащему внеклеточный домен IgV, за которым следует трансмембранный и внутриклеточный домен. Активация пути PD-1 приводит к ингибированию активации иммунных клеток, такому как снижение пролиферации клеток, снижение выживаемости клеток и ингибирование воспалительных
20 цитокинов (например, IFN γ , TNF α и IL-2). PD-1 экспрессируется на недавно активированных иммунных клетках, таких как Т-клетки, В-клетки, НКТ-клетки, моноциты и дендритные клетки; и его экспрессия жестко регулируется. Важность опосредованной PD-1 передачи сигналов в модулировании иммунного ответа человека была продемонстрирована успехом лечения онкологических пациентов
25 антагонистическими антителами против PD-1. У пациентов с раком, которые получают антагонистическое антитело против PD-1, побочные эффекты лечения имеют различные аутоиммунные проявления (Cappelli, L.C., et al., 2017; Hoffman, L., et al., 2016). Кроме того, существуют другие известные корреляции между активностью аутоиммунного заболевания и путём PD-1. Например, у пациентов с СКВ, страдающих от обострений,
30 обычно наблюдается низкая экспрессия PD-L1 (Mozaffarian, N., et al., 2008) и аутоантител к PD-1 (Shi, H., et al., 2017).

Следовательно, увеличение PD-1 опосредованной передачи сигналов представляет собой потенциальный подход к лечению аутоиммунных нарушений, что может привести к глубокой модификации заболевания и длительности ответа, а также к основным

преимуществам безопасности по сравнению с современными иммуномодулирующими препаратами. Эти современные методы лечения, в общем случае, в целом деактивируют иммунную систему организма (например, кортикостероиды и циклофосфамид). Однако PD-1 экспрессируется в основном на активированных иммунных клетках. Следовательно, антитела анти-PD-1 обладают способностью избирательно нацеливаться на клетки, которые активируются во время лечения, оставляя остальную часть репертуара иммунных клеток интактной.

В данной области техники прилагали усилия, чтобы доставлять агонистические антитела против PD-1 (Sharpe, A. and Pauken, E., *Nature Reviews Immunology* (2017)). Считается, что трудность доставки, по меньшей мере частично, является результатом сложных клеточных взаимодействий, необходимых для достижения агонизма PD-1 в физиологических условиях *in vitro* или *in vivo*. Следовательно, контекст анализа или модели, применяемых для идентификации терапевтических антител, явно важен при оценке активности агонистического антитела против PD-1.

Публикация заявки на патент США US20170088618 описывает антитела против PD-1 человека, которые в некоторых вариантах осуществления и в некоторых анализах *in vitro* ведут себя как агонисты со скоростями ассоциации и диссоциации по отношению к внеклеточному домену PD-1, что приводит к значениям K_D между 19-22 нМ (что определяется с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с применением VIAcore® T200).

Таким образом, существует потребность в альтернативных антителах против PD-1 человека, которые 1) связывают PD-1 человека с желаемыми скоростями ассоциации и диссоциации для оптимальной активности агониста, 2) агонизируют PD-1 человека в иммунологически релевантном контексте для достижения эффективности *in vivo*, 3) демонстрируют достаточную эффективность в качестве монотерапии для лечения и/или профилактики аутоиммунных нарушений или предотвращения отторжения трансплантата, 4) демонстрируют желаемую активность как часть комбинированной терапии с другими терапевтическими средствами для лечения и/или профилактики аутоиммунных нарушений или предотвращения отторжения трансплантата, и/или 5) предлагают эффективную альтернативу для смены лекарственного средства, когда во время лечения аутоиммунного нарушения другим агонистическим антителом против PD-1 человека терапия приостановлена из-за по меньшей мере одного нежелательного явления и/или неэффективности (в частности, снижения эффективности, опосредованного антителами против лекарственного средства (ADA)).

Соответственно, данное изобретение относится к новым гуманизированным агонистическим антителам IgG1 против PD-1 человека. Антитела по данному изобретению особенно выгодны по сравнению с антителами анти-PD-1 предшествующего уровня техники по различным причинам, включая, но не ограничиваясь этим, следующее:

5 1) они связывают PD-1 человека (а также PD-1 обезьяны яванского макака) с желаемыми скоростями ассоциации и диссоциации, 2) они могут быть терапевтически эффективными при более низких дозах или менее частых введениях дозы, 3) они ингибируют первичную пролиферацию Т-клеток человека *in vitro*, 4) они регулируют экспрессию PD-1 человека на поверхности клетки, 5) они ингибируют сигнальную активность Т-клеточных
10 рецепторов в анализе *in vitro* NFAT-репортерных клеток, 6) они обладают низким потенциалом иммуногенности терапевтического белка (то есть антител против лекарственного средства (ADA)), 7) они снижают активность заболевания в гуманизированной модели GvHD и/или 8) в модели волчаночного нефрита *in vivo* они ингибируют активацию иммунных клеток:

15 а) без значительной и/или определяемой комплемент-зависимой цитотоксичности,
б) без конкуренции с PD-L1/2 человека за связывание с PD-1 человека,
с) без индуцирования значительного и/или определяемого высвобождения цитокинов в анализах *in vitro*.

Кроме того, типовые агонистические антитела IgG1 против PD-1 человека по
20 данному изобретению также проявляют стабильность *in vivo*, физическую и химическую стабильность, включая, но не ограничиваясь этим, термическую стабильность, растворимость, низкую самоассоциацию и фармакокинетические характеристики, которые являются приемлемыми для разработки и/или применения в лечении аутоиммунных нарушений и/или отторжения трансплантата (то есть болезни «трансплантат против
25 хозяина»). Кроме того, описанные в данном документе полинуклеотидные последовательности, которые кодируют типовые агонистические антитела IgG1 против PD-1 человека по данному изобретению, были разработаны для применения предпочтительного кодона для значительного улучшения экспрессии антител в предпочтительных системах экспрессии клеточных линий млекопитающих, таких как
30 СНО.

В данном изобретении предлагается прогресс по сравнению с предшествующим уровнем техники, предоставляя композиции и способы, применимые для профилактики, подавления или ослабления аутоиммунных и/или иммунологических нарушений, связанных со стимуляцией иммунной контрольной точки, с помощью специально

сконструированного агонистического антитела IgG1 против PD-1 человека.

Агонистические антитела IgG1 против PD-1 человека по данному изобретению способны деактивировать или ослаблять иммунную патологию, предпочтительно, путем ингибирования адаптивного звена иммунного ответа, отмены антигенспецифического иммунного процесса и, таким образом, непосредственно воздействия на патологию, лежащую в основе заболевания. Клиническое применение таких антител может привести к длительной выносливости общего состояния или ремиссии заболевания (заболеваний), подлежащего лечению.

В данном изобретении предлагается антитело против PD-1 человека, содержащее:

10 1) переменную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 6, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и 2) переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8,
15 LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, при этом указанное антитело представляет собой подкласс 1 изотипа IgG (IgG1).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело против PD-1 человека, содержащее: 1) HCVR, имеющую аминокислотную
20 последовательность SEQ ID NO: 3; и 2) LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при этом указанное антитело представляет собой IgG1.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело против PD-1 человека, содержащее: 1) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и 2) легкую цепь, имеющую аминокислотную
25 последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело против PD-1 человека, состоящее из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

30 В данном изобретении также предлагается клетка млекопитающего, способная экспрессировать антитело против PD-1 человека, содержащее: 1) HCVR, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и 2) LCVR, содержащую LCDR1,

имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, при этом указанное антитело представляет собой IgG1.

5 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается клетка млекопитающего, способная экспрессировать антитело против PD-1 человека, содержащее: 1) HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и 2) LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при этом указанное антитело представляет собой IgG1.

10 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается клетка млекопитающего, способная экспрессировать антитело против PD-1 человека, содержащее: 1) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и 2) легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело
15 против PD-1 человека, состоящее из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В данном изобретении также предлагается способ продуцирования антитела против PD-1 человека, включающий: а) культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать указанное антитело, при этом указанное антитело содержит:
20 1) HCVR, включающую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и 2) LCVR, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, LCDR2,
25 имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, при этом указанное антитело представляет собой IgG1; и б) восстановление антитела.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ продуцирования антитела против PD-1 человека, включающий: а) культивирование
30 клетки млекопитающего, способной экспрессировать указанное антитело, при этом указанное антитело содержит: 1) HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и 2) LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при этом указанное антитело представляет собой IgG1; и б) восстановление антитела.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ продуцирования антитела против PD-1 человека, включающий: а) культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать указанное антитело, при этом указанное антитело содержит: 1) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и 2) легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и б) восстановление антитела.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ продуцирования агонистического антитела против PD-1 человека, включающий: а) культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать указанное антитело, при этом указанное антитело состоит из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и б) восстановление антитела.

В данном изобретении также предлагается антитело против PD-1 человека, полученное с помощью вышеупомянутых способов.

В данном изобретении также предлагается фармацевтическая композиция, содержащая антитело против PD-1 человека, полученное с помощью вышеупомянутых способов, а также приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В данном изобретении также предлагается молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 11 и 12. В данном изобретении также предлагается клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 11 и 12.

В данном изобретении предлагается фармацевтическая композиция, содержащая: 1) антитело против PD-1 человека, содержащее: а) HCVR, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и б) LCVR, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, при этом указанное антитело представляет собой IgG1; а также 2) приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая: 1) антитело против PD-1 человека, содержащее: а) HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

b) LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при этом указанное антитело представляет собой IgG1; а также 2) приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В данном изобретении предлагается фармацевтическая композиция, содержащая:

5 1) антитело против PD-1 человека, содержащее: а) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и б) легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; а также 2) приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления
данного изобретения антитело против PD-1 человека из вышеупомянутых
10 фармацевтических композиций состоит из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В данном контексте термин «PD-1» относится к белку 1 запрограммированной гибели клеток, также известному как белок 1 запрограммированной гибели (PD-1; CD279),
15 который является белком клеточной мембраны типа I, который принадлежит к расширенному семейству CD28/CTLA-4, содержащему внеклеточный IgV, домен, за которым следует трансмембранный и внутриклеточный домен.

В данном контексте термин «hPD-1» или «PD-1 человека» относится к PD-1 дикого типа человека, предпочтительно, PD-1 дикого типа человека, который имеет
20 аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13 (то есть, эталонная последовательность NCBI NP_005009.2).

Термины «супо», «яванский макак» или «обезьяна яванский макак» применяются в данном документе взаимозаменяемо. При применении в отношении полипептида PD-1
подразумевается, что указанные термины относятся к PD-1 дикого типа обезьяны
25 яванский макак и, предпочтительно, к PD-1 дикого типа обезьяны яванский макак, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

«Внеклеточный домен» полипептида PD-1 или «ECD» относится к форме полипептида PD-1, которая по существу не содержит трансмембранного и цитоплазматического доменов. Предпочтительно, ECD PD-1 имеет менее чем 1% трансмембранного и цитоплазматического домена, более предпочтительно, ECD PD-1
30 имеет менее чем 0,5% таких доменов. Еще более предпочтительно полипептид ECD PD-1 человека является таким, как продемонстрировано в SEQ ID NO: 14, а полипептид ECD PD-1 обезьяны яванский макак является таким, как продемонстрировано в SEQ ID NO: 16. ECD полипептида PD-1 может быть получен с помощью способов, известных в данной

области техники. В альтернативном варианте, ECD полипептида PD-1 человека может быть приобретен коммерчески у различных поставщиков, таких как Sino Biological (Пекин, Китай; эталонный № 10377-H08) и R&D Systems (Миннеаполис, штат Миннесота, США; кат. № 8986-PD). ECD полипептида PD-1 яванского макака может быть приобретен 5 коммерчески у компании R&D Systems (Миннеаполис, штат Миннесота, США; кат. № 8509-PD).

В данном контексте термин «агонистическое антитело против PD-1 человека» относится к антителу, которое связывается с PD-1 человека и при введении *in vivo* приводит по меньшей мере к одному значительному уменьшению аутоиммунной 10 активности, такому как снижение титров анти-двухцепочечной ДНК (ds-ДНК), снижение показателей бальной оценки заболевания или снижение уровня воспалительных цитокинов.

В данном контексте термин «антитело 1» относится к антителу, связывающему PD-1 человека, содержащему: 1) HCVR, имеющую аминокислотную последовательность 15 HCDR1 SEQ ID NO: 5, аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 6, аминокислотную последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 7; и 2) LCVR, имеющую аминокислотную последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 8, аминокислотную последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 9, аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 10, аминокислотную последовательность HCVR SEQ ID NO: 3, 20 аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность HC SEQ ID NO: 1 и аминокислотную последовательность LC SEQ ID NO: 2.

В данном контексте термин «антитело» относится к сконструированному не встречающемуся в природе полипептидному комплексу, имеющему две тяжелые цепи 25 (HC) и две легкие цепи (LC), так что тяжелые цепи и легкие цепи связаны дисульфидными связями, при этом указанное антитело является изотипическим антителом IgG. Применяемый в отношении антител по данному изобретению термин «антитело» относится к антителу, которое является подклассом 1 изотипического IgG (то есть, IgG1) и имеет «тяжелые» цепи и «легкие» цепи, которые сшиты с помощью внутри- и 30 межцепочечных дисульфидных связей. Каждая легкая цепь образует дисульфидные связи с тяжелой цепью, а две тяжелые цепи образуют две дисульфидные связи между собой. Каждая тяжелая цепь состоит из N-концевой HCVR и константной области тяжелой цепи («HCCR»). Каждая легкая цепь состоит из N-концевой LCVR и константной области легкой цепи («LCCR»). При экспрессии в определенных биологических системах

антитела, имеющие Fc-последовательности, являются гликозилированными в Fc-области. Как правило, гликозилирование происходит в Fc-области антитела в высококонсервативном сайте N-гликозилирования. N-гликаны, как правило, присоединяются к аспарагину. Антитела могут быть гликозилированы и в других положениях.

Предпочтительно антитела по данному изобретению содержат Fc-часть, которая является подтипом IgG1 человека. Хорошо известно, что IgG1 человека связывается с семейством рецепторов Fc-гамма (FcγR), а также с C1q. Взаимодействие с этими рецепторами может индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

Константная область тяжелых цепей содержит домены CH1, CH2 и CH3. CH1 идет после HCVR; при этом CH1 и HCVR образуют часть тяжелой цепи Fab. CH2 идет после шарнирной области и перед CH3. CH3 идет после CH2 и находится в карбокси-конце тяжелой цепи. Константная область легких цепей содержит один домен, CL. CL идет после LCVR; при этом CL и LCVR образуют часть легкой цепи Fab. Предпочтительно CL-области агонистических антител против PD-1 человека по данному изобретению относятся к подтипу каппа человека (например, SEQ ID NO: 18).

Молекула ДНК согласно данному изобретению представляет собой не встречающуюся в природе молекулу ДНК, которая содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность одного из полипептидов в антителе согласно данному изобретению (например, тяжелая цепь, легкая цепь, переменная тяжелая цепь и переменная легкая цепь).

Области HCVR и LCVR антитела по данному изобретению могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность («CDR»), перемежающимися с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями («FR»). Каждая LCVR и HCVR состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В данном документе три CDR тяжелой цепи обозначены как «HCDR1, HCDR2 и HCDR3», а три CDR легкой цепи обозначены как «LCDR1, LCDR2 и LCDR3». CDR содержат большинство остатков, которые образуют специфические взаимодействия с антигеном. Определение CDR по Кабату (Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) основано на вариабельности

последовательности антител. Определение CDR по Чотиа (Chothia et al., “Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins”, *Journal of Molecular Biology*, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani et al., “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, *Journal of Molecular Biology*, 273, 927-948 (1997)) основано на

5 трехмерных структурах антител и топологиях CDR-петель. Определения CDR по Чотиа идентичны определениям CDR по Кабату, за исключением HCDR1 и HCDR2.

Определение CDR по Норсу (North et al., “A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations”, *Journal of Molecular Biology*, 406, 228-256 (2011)) основано на

10 кластеризации распространения аффинности с большим количеством кристаллических структур. Для целей данного изобретения, назначение аминокислот доменам CDR в областях LCVR и HCVR антител по данному изобретению основано на хорошо известной конвенции по нумерации по Кабату (Kabat, et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-93 (1971); Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)), и конвенции по нумерации

15 по Норсу (North et al., *A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations*, *Journal of Molecular Biology*, 406:228-256 (2011)). В случае CDR легкой цепи антител по данному изобретению применяются определения CDR по Норсу. В тяжелой цепи как HCDR1, так и HCDR3 также применяются определения по Норсу. В HCDR2 применяется гибрид определений по Норсу и Кабату. Определение по Норсу применяют для идентификации

20 начального N-терминального участка, а определение по Кабату - для определения последнего положения.

Выделенную ДНК, кодирующую область HCVR, можно преобразовать в полноразмерный ген тяжелой цепи путем функционального связывания HCVR-кодирующей ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой

25 цепи. Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека, а также других млекопитающих известны в данной области техники. Фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получить, например, с помощью стандартной ПЦР-амплификации.

Выделенную ДНК, кодирующую область LCVR, можно преобразовать в

30 полноразмерный ген легкой цепи путем функционального связывания LCVR-кодирующей ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи. Последовательности генов константной области легкой цепи человека, а также других млекопитающих известны в данной области техники. Фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получать с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная

область легкой цепи может представлять собой константную область каппа или лямбда. Предпочтительно для антител по данному изобретению константная область легкой цепи представляет собой константную область каппа.

Полинуклеотиды по данному изобретению могут быть экспрессированы в клетке-хозяине после функционального соединения указанных последовательностей с последовательностью контроля экспрессии. Экспрессионные векторы, как правило, пригодны для репликации в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде неотъемлемой части хромосомной ДНК хозяина. Обычно экспрессионные векторы содержат селективные маркеры, например, тетрациклин, неомицин и дигидрофолатредуктаза, чтобы обеспечить возможность обнаружения тех клеток, которые трансформированы необходимыми последовательностями ДНК.

Антитела по данному изобретению легко можно получить в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO, NS0, HEK293 или COS. Клетки-хозяева культивируют, применяя методики, хорошо известные в данной области техники.

Векторы, содержащие представляющие интерес полинуклеотидные последовательности (например, полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антитела, и последовательности контроля экспрессии), могут быть перенесены в клетку-хозяина с помощью хорошо известных способов, которые изменяются в зависимости от типа клетки-хозяина.

Различные способы очистки белка могут применяться для очистки белков, включая антитела, но не ограничиваясь ими, при этом такие способы известны в данной области техники.

В другом варианте осуществления данного изобретения антитело или кодирующие его нуклеиновые кислоты предлагаются в выделенной форме. В данном контексте термин «выделенный» относится к белку, пептиду или нуклеиновой кислоте, которые не содержат или по существу не содержат любые другие макромолекулярные компоненты, обнаруживаемые в клеточной среде. В данном контексте термин «по существу не содержит» означает, что представляющие интерес белок, пептид или нуклеиновая кислота содержат более 80% (в мольном отношении) макромолекулярных компонентов, предпочтительно более 90% и более предпочтительно более 95%.

Антитело по данному изобретению или фармацевтическую композицию, содержащую его, можно вводить парентеральными путями, неограничивающими примерами которых являются подкожное введение и внутривенное введение. Антитело по данному изобретению можно вводить пациенту отдельно с фармацевтически

приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами в
однократной или многократных дозах. Фармацевтические композиции по данному
изобретению можно приготовить с помощью способов, хорошо известных в данной
области техники (например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd ed.
5 (2012), A. Loyd et al., Pharmaceutical Press), и при этом они будут содержать антитело,
описанное в данном документе, и один или большее количество фармацевтически
приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

В данном контексте термин «аутоиммунное заболевание» или «аутоиммунное
нарушение» применяется в данном документе взаимозаменяемо и относится к
10 нежелательным патологическим состояниям, которые возникают в результате
нефизиологических или нежелательных иммунных реакций против собственных клеток
и/или тканей или трансплантированных клеток и/или тканей. Термин «аутоиммунное
заболевание» или «аутоиммунное нарушение» предназначен для включения таких
патологических состояний, независимо от того, опосредованы ли они гуморальным или
15 клеточным иммунным ответом. Типовые аутоиммунные заболевания или нарушения
включают, но не ограничиваются ими, реакция «трансплантат против хозяина» (GVHD),
отторжение трансплантата твердого органа, васкулит, системную красную волчанку
(SLE), сахарный диабет 1 типа (T1DM), рассеянный склероз (MS), гигантоклеточный
артериит (GCA), псориаз (PsO), псориатический артрит (PsA), ревматоидный артрит (RA),
20 воспалительное заболевание кишечника (IBD), язвенный колит (UC), анкилозирующий
спондилит (AS), синдром Шегрена (SjS), аутоиммунный гепатит, склеродермию,
целиакию, болезнь Аддисона, болезнь Хасимото, болезнь Грейвса, атрофический
гастрит/пернициозную анемию, приобретенный гипогонадизм/бесплодие, гипопаратиреоз,
положительно-гемолитическую анемию Кумбса, хронические аллергические заболевания
25 (такие как астма, сенная лихорадка или аллергический ринит), болезнь Крона, мужское
или женское бесплодие, болезнь Бехчета, гранулематоз Вегенера, миокардит, миозит,
ревматическую полимиалгию (PMR), самопроизвольный аборт, витилиго, атеросклероз,
аутоиммунный панкреатит, буллезный пемфигоид, хронические вирусные инфекции и
миастенья гравис. Для целей данного изобретения предпочтительными аутоиммунными
30 заболеваниями являются реакция «трансплантат против хозяина» (GVHD), отторжение
трансплантата твердого органа, васкулит, системная красная волчанка (SLE), сахарный
диабет 1 типа (T1DM), рассеянный склероз (MS), гигантоклеточный артериит (GCA),
псориаз (PsO), псориатический артрит (PsA), ревматоидный артрит (RA), воспалительное

заболевание кишечника (IBD), язвенный колит (UC), анкилозирующий спондилит (AS), синдром Шегрена (SjS), аутоиммунный гепатит и склеродермия.

В данном контексте термин «около» подразумевает плюс или минус десять процентов от заявленного значения или диапазона значений. Например: «около» 12, 5 включает значения в диапазоне от 10,8 (включительно) до 13,2 (включительно); около 10 мас. % охватывает структуру, которая включает от 9 (включительно) до 11 (включительно) мас. % ; и тому подобное.

В данном контексте термин «связывает» в отношении аффинности агонистического антитела IgG1 против PD-1 человека к PD-1 человека (SEQ ID NO: 13) 10 или ECD PD-1 человека, предпочтительно ECD PD-1 человека, как продемонстрировано в SEQ ID NO: 14, предназначен для обозначения, если не указано иное, значения K_D , равного около 1×10^{-7} М, около 1×10^{-8} М, около 1×10^{-9} М, около 5×10^{-9} М, около 1×10^{-10} М, что определено с помощью способов, известных в данной области техники, и/или с помощью способов, в основном таких, как описано в данном документе, включая, но не 15 ограничиваясь этим, применение биосенсора поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 25 °C или 37 °C. Более предпочтительно, агонистическое антитело IgG1 против PD-1 человека по данному изобретению связывается с PD-1 человека (то есть SEQ ID NO: 13) или с ECD PD-1 человека (например, SEQ ID NO: 14) со значением K_D , составляющим от около 1×10^{-8} М до около 5×10^{-10} М, что определено с помощью способов, известных 20 в данной области техники, и/или с помощью способов, в основном таких, как описано в данном документе, включая применение биосенсора SPR при 25 °C или 37 °C. Еще более предпочтительно, чтобы такое антитело обладало аффинностью к PD-1 человека (то есть SEQ ID NO: 13) или с ECD PD-1 человека (например, SEQ ID NO: 14) в пределах около 5×10^{-8} М и около 5×10^{-10} М, что определено с помощью способов, известных в данной 25 области техники, и/или с помощью способов, в основном таких, как описано в данном документе, включая применение биосенсора SPR при 25 °C или 37 °C. Еще более предпочтительно, чтобы такое антитело имело значения K_{on} и K_{off} для ECD PD-1 человека (например, SEQ ID NO: 14) от около $1,0 \times 10^{-4}$ до около $1,0 \times 10^{-3}$ и от около $1,3 \times 10^5$ до около $2,0 \times 10^5$ соответственно (что определено с помощью SPR с применением 30 ВІАсоге[®]8К, по существу, как описано в данном документе).

В контексте моноклональных антител термины «человек», «гуманизированный» и «полностью человеческий» хорошо известны специалистам в данной области техники (Weiner LJ, *J. Immunother.* 2006; 29: 1-9; Mallbris L, *et al.*, *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 2016; 9: 13-15).

В данном контексте термин «адаптивный иммунитет» включает тип иммунного ответа, который, в отличие от врожденного иммунного ответа, является антигенспецифичным и демонстрирует усиленные вторичные антигенспецифические иммунные ответы при повторной стимуляции тем же антигеном.

5 Термин «лечение» (или «лечить», или «процесс лечения») относится к замедлению, прерыванию, приостановке, облегчению, прекращению, уменьшению или обращению вспять прогрессирования или тяжести существующего симптома, нарушения, патологического состояния или заболевания.

«Эффективное количество» означает такое количество агонистического антитела
10 IgG1 против PD-1 человека по данному изобретению или фармацевтической композиции, содержащей такое антитело, которое вызывает биологический или клинический ответ или необходимый терапевтический эффект в ткани, системе, организме животного, млекопитающего или человека, который предполагается исследователем, врачом или другим медицинским работником. Эффективное количество антитела может изменяться в
15 зависимости от таких факторов, как патологическое состояние, возраст, пол и масса индивидуума, и способности антитела вызывать желаемый ответ у индивидуума. Эффективное количество также является таким, при котором любой токсический или вредный эффект антитела перевешивается терапевтически благоприятными эффектами. Такое преимущество включает в себя любой из следующих факторов: повышенную
20 иммунную толерантность трансплантированных органов; стабилизированное аутоиммунное заболевание или нарушение; или ослабление признаков или симптомов аутоиммунного нарушения и т. д. Специалист в данной области техники может легко определить эффективное количество, применяя для этого известные методики и наблюдая результаты, полученные при аналогичных обстоятельствах. При определении
25 эффективного количества для пациентов лечащий врач-диагност учитывает множество факторов, включая, но не ограничиваясь ими: конституцию пациента; его массу, возраст и общее состояние здоровья; конкретное рассматриваемое заболевание или нарушение; степень или вовлечение в патологический процесс, или тяжесть заболевания или нарушения; ответ конкретного пациента; конкретное вводимое соединение; способ
30 введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранную схему лечения; применение сопутствующих лекарственных препаратов; и другие значимые обстоятельства.

В данном контексте термин «эффективный ответ» пациента или «ответ» пациента на лечение относится к клинической или терапевтической пользе, которую пациент

получает при введении антитела по данному изобретению. Такая польза включает в себя любое одно или большее количество из следующих явлений: повышенную иммунную толерантность трансплантированных органов; стабилизированное аутоиммунное заболевание или нарушение; или ослабление признаков или симптомов аутоиммунного нарушения и т. д.

5
10
15
20
Потенциальным преимуществом способов, описанных в данном документе, является возможность достижения выраженного и/или длительного облегчения состояния у пациента, страдающего аутоиммунным нарушением, с приемлемым профилем безопасности, включающим приемлемую переносимость, уровень токсичности и/или нежелательные явления, так что пациент получает пользу от способа лечения в целом. Эффективность лечения по данному изобретению может быть измерена с помощью различных критериев, которые обычно применяются при оценке лечения различных аутоиммунных нарушений, включая, но не ограничиваясь этим, индекс Американского колледжа ревматологии (ACR) 20, ACR50, ACR70, индекс площади и тяжести псориаза (PASI) 50, PASI75, PASI90, PASI100, индекс активности системной красной волчанки (SLEDAI). Необязательно могут применяться различные другие подходы к определению эффективности любой конкретной терапии по данному изобретению, включая, например, маркеры активации иммунных клеток, показатели воспаления, визуализацию измерения зависимых от клеточного цикла биомаркеров и/или измерение ответа посредством оценки боли.

25
30
Образование противолечательных антител к биологическим препаратам может снизить эффективность лечения из-за образования нейтрализующих антител или более быстрой фармакокинетики. В некоторых редких случаях ADA также могут быть ассоциированы с проблемами безопасности. Аутоиммунные заболевания являются хроническими, требующими длительного лечения. Следовательно, часто существует потребность в альтернативных способах лечения, когда терапевтическое биологическое лекарственное средство (например, терапевтическое антитело) перестает быть эффективным. Чтобы преодолеть проблемы с иммуногенностью с течением времени, последовательное применение биопрепаратов, даже тех, которые нацелены на одну и ту же мишень, например, ингибиторы TNF, является широко распространенной и широко применяемой практикой лечения при аутоиммунных нарушениях (см., например, Lloyd, S., et al. (2010) The effectiveness of anti-TNF α therapies when used sequentially in rheumatoid arthritis patients: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology*, 49:2313-21).

В данном изобретении предлагается антитело против PD-1 человека, содержащее:

1) HCVR, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и

2) LCVR, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, при этом указанное антитело представляет собой IgG1. Предпочтительно, чтобы такое антитело связывалось с PD-1 человека (то есть SEQ ID NO: 13) или ECD PD-1 человека (например, SEQ ID NO: 14), со значением K_D , составляющим около 1×10^{-7} М, около 1×10^{-8} М, около 1×10^{-9} М, около 5×10^{-9} М или около 1×10^{-10} М, что определено с помощью способов, известных в данной области техники, и/или с помощью способов, по существу, как описано в данном документе, включая, но не ограничиваясь этим, применение биосенсора поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 25 °С или 37 °С.

Предпочтительно, чтобы такое антитело связывалось с PD-1 человека (то есть SEQ ID NO: 13) или ECD PD-1 человека (например, SEQ ID NO: 14), со значением K_D , составляющим от около 1×10^{-8} М до около 5×10^{-10} М, что определено с помощью способов, известных в данной области техники, и/или с помощью способов, по существу, как описано в данном документе, включая, но не ограничиваясь этим, применение биосенсора поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 25 °С или 37 °С. Более предпочтительно, чтобы такое антитело связывалось с PD-1 человека (то есть SEQ ID NO: 13) или ECD PD-1 человека (например, SEQ ID NO: 14), со значением K_D , составляющим от около 5×10^{-8} М до около 5×10^{-10} М, что определено с помощью способов, известных в данной области техники, и/или с помощью способов, по существу, как описано в данном документе, включая, но не ограничиваясь этим, применение биосенсора поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 25 °С или 37 °С.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело против PD-1 человека, содержащее:

1) HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

2) LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при этом указанное антитело представляет собой IgG1. Предпочтительно, чтобы такое антитело связывалось с PD-1 человека (то есть SEQ ID NO: 13) или ECD PD-1 человека (например, SEQ ID NO: 14), со значением K_D , составляющим около 1×10^{-7} М, около 1×10^{-8} М, около 1×10^{-9} М, около 5×10^{-9} М или около 1×10^{-10} М, что определено с помощью способов, известных в данной области техники, и/или с помощью способов, по

существо, как описано в данном документе, включая, но не ограничиваясь этим, применение биосенсора поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 25 °С или 37 °С. Более предпочтительно, чтобы такое антитело связывалось с PD-1 человека (то есть SEQ ID NO: 13) или ECD PD-1 человека (например, SEQ ID NO: 14), со значением K_D , составляющим от около 1×10^{-8} М до около 5×10^{-10} М, что определено с помощью способов, известных в данной области техники, и/или с помощью способов, по существу, как описано в данном документе, включая, но не ограничиваясь этим, применение биосенсора поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 25 °С или 37 °С. Еще более предпочтительно, чтобы такое антитело связывалось с PD-1 человека (то есть SEQ ID NO: 13) или ECD PD-1 человека (например, SEQ ID NO: 14), со значением K_D , составляющим от около 5×10^{-8} М до около 5×10^{-10} М, что определено с помощью способов, известных в данной области техники, и/или с помощью способов, по существу, как описано в данном документе, включая, но не ограничиваясь этим, применение биосенсора поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 25 °С или 37 °С.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело против PD-1 человека, содержащее:

- 1) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и
- 2) легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело против PD-1 человека, состоящее из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, чтобы такое антитело связывалось с PD-1 человека (то есть SEQ ID NO: 13) или ECD PD-1 человека (например, SEQ ID NO: 14), со значением K_D , составляющим около 1×10^{-7} М, около 1×10^{-8} М, около 1×10^{-9} М, около 5×10^{-9} М или около 1×10^{-10} М, что определено с помощью способов, известных в данной области техники, и/или с помощью способов, по существу, как описано в данном документе, включая, но не ограничиваясь этим, применение биосенсора поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 25 °С или 37 °С. Более предпочтительно, чтобы такое антитело связывалось с PD-1 человека (то есть SEQ ID NO: 13) или ECD PD-1 человека (например, SEQ ID NO: 14), со значением K_D , составляющим от около 1×10^{-8} М до около 5×10^{-10} М, что определено с помощью способов, известных в данной области техники, и/или с помощью способов, по существу, как описано в данном документе, включая, но не ограничиваясь этим, применение биосенсора поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 25 °С или 37 °С. Еще более предпочтительно, чтобы такое антитело

связывалось с PD-1 человека (то есть SEQ ID NO: 13) или ECD PD-1 человека (например, SEQ ID NO: 14), со значением K_D , составляющим от около 5×10^{-8} М до около 5×10^{-10} М, что определено с помощью способов, известных в данной области техники, и/или с помощью способов, по существу, как описано в данном документе, включая, но не ограничиваясь этим, применение биосенсора поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 25 °С или 37 °С.

В данном изобретении также предлагается клетка млекопитающего, способная экспрессировать антитело против PD-1 человека, содержащее: HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, при этом указанное антитело представляет собой IgG1.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается клетка млекопитающего, способная экспрессировать антитело против PD-1 человека, содержащее HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при этом указанное антитело представляет собой IgG1.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается клетка млекопитающего, способная экспрессировать антитело против PD-1 человека, содержащее тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается клетка млекопитающего, способная экспрессировать антитело против PD-1 человека, состоящее из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В данном изобретении также предлагается способ продуцирования антитела против PD-1 человека, включающий: 1) культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать антитело против PD-1 человека, содержащее HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, LCDR1, имеющую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 8, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, при этом указанное антитело представляет собой IgG1; и 2) восстановление антитела.

5 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ продуцирования антитела против PD-1 человека, включающий: 1) культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать антитело против PD-1 человека, содержащее HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при этом указанное
10 антитело представляет собой IgG1; и 2) восстановление антитела.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ продуцирования антитела против PD-1 человека, включающий: 1) культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать антитело против PD-1 человека, содержащее тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:
15 1, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и 2) восстановление антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ продуцирования антитела против PD-1 человека, включающий: 1) культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать антитело против PD-1 человека, состоящее из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную
20 последовательность SEQ ID NO: 1, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и 2) восстановление антитела. В данном изобретении также предлагается антитело против PD-1 человека, полученное с помощью указанного способа, а также приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В данном изобретении предлагается молекула ДНК, содержащая полинуклеотид,
25 имеющий последовательность SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 11 и 12. В данном изобретении также предлагается клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 11 и 12.

В данном изобретении предлагается фармацевтическая композиция, содержащая 1)
30 антитело против PD-1 человека, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, LCDR2, имеющую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 9, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, при этом указанное антитело представляет собой IgG1; а также 2) приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело против PD-1 человека содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при этом указанное антитело представляет собой IgG1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело против PD-1 человека содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело против PD-1 человека состоит из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

Роль пути PD-1 как контрольной точки для иммунитета была тщательно изучена. Известно, что когда стимулируется путь PD-1, активность иммунной системы обычно снижается, что может быть использовано для лечения аутоиммунных нарушений, индукции иммунной толерантности и/или ослабления проявлений реакции «трансплантат против хозяина».

В данном изобретении предлагается способ лечения аутоиммунного нарушения, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела против PD-1 человека, содержащего: 1) HCVR, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и 2) LCVR, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, при этом указанное антитело представляет собой IgG1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения аутоиммунного нарушения, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела против PD-1 человека, содержащего: 1) HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и 2) LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при этом указанное антитело представляет собой IgG1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения аутоиммунного нарушения, включающий

введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела против PD-1 человека, содержащего: 1) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и 2) легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения также предлагается

5 указанное, состоящее из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В таких вариантах осуществления данного изобретения также предполагается, что аутоиммунное нарушение представляет собой

10 GVHD, отторжение трансплантированного твердого органа, васкулит, SLE, T1DM, MS, GCA, PsO, PsA, RA, IBD, UC, AS, SjS, аутоиммунный гепатит, склеродерму, целиакию, болезнь Аддисона, болезнь Хашимото, болезнь Грейвса, атрофический гастрит/пернициозную анемию, приобретенный гипогонадизм/бесплодие, гипопаратиреоз, позитивно-гемолитическую анемию Кумбса, хронические аллергические заболевания (такие как астма, сенная лихорадка или аллергический ринит), болезнь Крона, мужское

15 или женское бесплодие, болезнь Бехчета, гранулематоз Вегенера, миокардит, миозит, PMR, самопроизвольный аборт, витилиго, атеросклероз, аутоиммунный панкреатит, буллезный пемфигоид, хронические вирусные инфекции или миастению гравис.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения также предполагается, что указанное антитело вводят в комбинации с другими терапевтическими агентами,

20 применяемыми для лечения аутоиммунных нарушений.

В данном документе описано антитело против PD-1 человека по данному изобретению для применения в терапии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело против PD-1 человека, содержащее: 1) HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и 2) LCVR, имеющую

25 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при этом указанное антитело представляет собой IgG1 для применения в терапии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело против PD-1 человека, содержащее: 1) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, для

30 применения в терапии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения также предлагается указанное, состоящее из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предполагается, что указанная терапия

предназначена для лечения аутоиммунного нарушения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предполагается, что указанное аутоиммунное нарушение представляет собой GVHD, отторжение трансплантированного твердого органа, васкулит, SLE, T1DM, MS, GCA, PsO, PsA, RA, IBD, UC, AS, SjS, аутоиммунный гепатит, склеродерму, целиакию, болезнь Аддисона, болезнь Хашимото, болезнь Грейвса, атрофический гастрит/пернициозную анемию, приобретенный гипогонадизм/бесплодие, гипопаратиреоз, позитивно-гемолитическую анемию Кумбса, хронические аллергические заболевания (такие как астма, сенная лихорадка или аллергический ринит), болезнь Крона, мужское или женское бесплодие, болезнь Бехчета, гранулематоз Вегенера, миокардит, миозит, PMR, самопроизвольный аборт, витилиго, атеросклероз, аутоиммунный панкреатит, буллезный пемфигоид, хронические вирусные инфекции или миастению гравис. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предполагается, что указанное антитело вводят в комбинации с другим терапевтическим агентом для лечения аутоиммунного нарушения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения также предполагается, что указанное антитело вводят (или должны вводить) в 5 10 15

одновременной, раздельной или последовательной комбинации с другим терапевтическим агентом для лечения аутоиммунного нарушения.

В данном документе описано антитело против PD-1 человека по данному изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения аутоиммунного нарушения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело против PD-1 человека, содержащее: 1) HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и 2) LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при этом указанное антитело представляет собой IgG1, для изготовления лекарственного средства для лечения аутоиммунного нарушения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело против PD-1 человека, содержащее: 1) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и 2) легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2., для изготовления лекарственного средства для лечения аутоиммунного расстройства. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения также предлагается указанное, состоящее из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления данного изобретения предполагается, что указанное лекарственное средство предназначено для лечения аутоиммунного нарушения. В некоторых вариантах 20 25 30

осуществления данного изобретения предполагается, что указанное лекарственное средство предназначено для лечения GVHD, отторжения трансплантированного твердого органа, васкулита, SLE, T1DM, MS, GCA, PsO, PsA, RA, IBD, UC, AS, SjS, аутоиммунного гепатита, склеродермы целиакии, болезни Аддисона, болезни Хашимото, болезни Грейвса, атрофического гастрита/пернициозной анемии, приобретенного гипогонадизма/бесплодие, гипопаратиреоза, позитивно-гемолитической анемии Кумбса, хронических аллергических заболеваний (таких как астма, сенная лихорадка или аллергический ринит), болезни Крона, мужского или женского бесплодия, болезни Бехчета, гранулематоза Вегенера, миокардита, миозита, PMR, самопроизвольного аборта, витилиго, атеросклероза, аутоиммунной панкреатита, буллезного пемфигоида, хронических вирусных инфекций или миастении гравис.

Схемы введения могут быть скорректированы для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического эффекта). Дозы лекарственного средства могут титроваться для оптимизации безопасности и эффективности. Схемы введения доз для внутривенного (внутривенного) или не внутривенного введения, подкожного (п/к) локализованного или системного введения или их комбинаций, как правило, будут варьироваться от однократной болюсной дозы или непрерывной инфузии до множества подкожных введений в месяц, предпочтительно, не чаще, чем один раз в день, более предпочтительно, не чаще, чем один раз в неделю, еще более предпочтительно, не чаще, чем один раз в каждые две недели, еще более предпочтительно, не чаще, чем один раз в месяц или как назначено лечащим врачом и обусловлено состоянием пациента. Количество и частота введения доз могут быть определены врачом (врачами), который лечит пациента.

25

Пример 1. Экспрессия и очистка антител

Аминокислотные последовательности CDR варибельной области тяжелой цепи и легкой цепи, полные аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи Антитела 1 и нуклеотидные последовательности, кодирующие их, перечислены ниже в разделе, озаглавленном «Аминокислотные и нуклеотидные последовательности». Кроме того, SEQ ID NO аминокислотных последовательностей легкой цепи, тяжелой цепи, LCVR и HCVR Антитела 1 приведены в Таблице 1(a) ниже. Кроме того, в Таблице 1(a) приведены SEQ ID NO для аминокислотных последовательностей CDR варибельной области HC и варибельной области LC Антитела 1.

Антитела по данному изобретению, включая, но не ограничиваясь ими, Антитело 1, можно изготовить и очистить по существу следующим образом. Соответствующая клетка-хозяин, такая как, но не ограничиваясь этим, НЕК 293 или СНО, может быть либо временно, либо стабильно трансфицирована системой экспрессии для секреции антител с помощью, например, одного вектора, кодирующего экспрессию тяжелой цепи и легкой цепи, или с помощью двух векторов, из которых один кодирует тяжелую цепь, а другой кодирует легкую цепь (применяя оптимальное заранее определенное соотношение векторов НС:LC (например, 1:3 или 1:2).

Поскольку эффективная экспрессия терапевтических антител в клетках млекопитающих часто является критическим фактором для коммерческого успеха терапевтического антитела, кДНК, кодирующая Антитело 1, была оптимизирована путем тестирования множества вариантов кодонов, включая некоторые, полученные из коммерчески доступных служб оптимизации кодонов для сигнальной последовательности и переменных областей. Полинуклеотиды, продемонстрированные в SEQ ID NO: 11 и 12, кодирующие тяжелую и легкую цепь Антитела 1, соответственно, применяли для генерации линии клеток, которая эффективно продуцирует повышенные титры (например, предпочтительно, примерно до 6 раз, более предпочтительно, примерно до 7 раз, еще более предпочтительно, примерно до 8 раз, еще более предпочтительно, примерно до 9 раз, еще более предпочтительно, до 10 раз, еще более предпочтительно, до 11 раз выше по сравнению с аналогичной линией клеток СНО, экспрессирующей полинуклеотид, как продемонстрировано в SEQ ID NO: 12, и полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь Антитела 1, который не был оптимизирован в отношении применения кодонов в стабильной линии клеток СНО.

Среда, в которую секретировалось Антитело 1, может быть очищена с помощью любой из многих обычно применяемых методик. Например, в случае фрагмента Fab среда может быть нанесена на колонку MabSelect (GE Healthcare) или колонку CaptaSelect (GE Healthcare), уравновешенную совместимым буфером, таким как фосфатно-солевой буфер (рН 7,4). Колонка может быть промыта для удаления неспецифических связывающих компонентов. Связанное антитело может быть элюировано, например, с помощью градиента рН (например, 20 мМ Трис-буфера рН 7 к 10 мМ цитратного натриевого буфера, рН 3,0, или фосфатно-солевым буфером рН 7,4 к 100 мМ глицинового буфера, рН 3,0). Обнаружение фракций антител можно проводить, например, с помощью УФ-абсорбции или ДСН-ПААГ электрофореза, а затем проводить их объединение. Растворимые агрегаты и мультимеры могут быть эффективно удалены с помощью

обычных способов, включая эксклюзионную, с гидрофобным взаимодействием, ионообменную, мультимодальную или гидроксапатитную хроматографию. Антитело может быть сконцентрировано, заменено буфером и/или стерильно отфильтровано с помощью обычных методик. Полученный продукт может храниться при 4-5 °С или может быть незамедлительно заморожен при -80 °С или может быть лиофилизирован.

Таблица 1(а): SEQ ID NO для агонистического антитела против PD-1 человека

Антитело 1	
Аминокислотная последовательность для	SEQ ID NO:
Тяжелая цепь	1
Легкая цепь	2
HCVR	3
LCVR	4
HCDR1	5
HCDR2	6
HCDR3	7
LCDR1	8
LCDR2	9
LCDR3	10
ДНК-кодирующая последовательность для:	SEQ ID NO:
HC	11
LC	12

Таблица 1(б): SEQ ID NO для последовательностей PD-1

Аминокислотная последовательность для:	SEQ ID NO:
PD-1 человека	13
ECD PD-1 человека	14
PD-1 обезьяны яванский макак	15
ECD PD-1 обезьяны яванский макак	16

Пример 2. Антитело 1 связывается с PD-1 человека и обезьяны яванский макак на клеточной поверхности.

Способность агонистических антител против PD-1 человека, описанных в данном документе, связываться с клеточной поверхностью PD-1 человека или обезьяны яванский макак может быть измерена с помощью анализа проточной цитометрии. PD-1 человека и обезьяны яванский макак (то есть, как продемонстрировано в SEQ ID NO: 13 и 15 соответственно), экспрессирующие стабильные клетки, генерируют путем трансфекции плазмидной ДНК PD-1 человека или обезьяны яванский макак в клетки яичника китайского хомяка (CHO-k1; Lonza) с помощью системы электропорации (Gene Pulser Xcell; BioRad) в соответствии с известными протоколами. Стабильные клетки отбирают из отдельных выделенных клеток, применяя для этого 500 мкг/мл G418 (Thermo Scientific) в культуральной среде. Для проведения проточной цитометрии, клетки переносят на 96-луночный планшет с V-образным дном лунок с плотностью 1×10^5 клеток/лунку. Клетки промывают 1x буфером FACS (Becton Dickinson # 554656). Добавляют Антитело 1 или контрольный IgG1 человека (разведенный в буфере FACS при трехкратном 12-точечном титровании антител, начиная с 100 микрограмм/мл) (в 100 микролитрах), и инкубируют клетки при 4 °C в течение 30 минут.

После двукратной промывки в буфере FACS, добавляют FITC-конъюгированный $F(ab')^2$ фрагмент козьего антитела против IgG человека, специфичное для Fc γ -фрагмента вторичное антитело (Jackson ImmunoResearch Laboratories 109-096-170) в разведении 1:200 и клетки инкубируют при 4 °C в течение 30 минут. После двукратной промывки в буфере FACS, проводят окрашивание живых/мертвых клеток с применением SytoxBlue (Invitrogen, # S34857) в соответствии с протоколом производителя. Клетки обрабатывают на приборе для проточной цитометрии Fortessa, Fortessa Fx или LSR II. Данные проточной цитометрии анализируют с помощью программного обеспечения FlowJo. Средние геометрические значения интенсивности флуоресценции (GMFI) применяются для расчета относительного EC₅₀ на основе логистической регрессии с 4 параметрами.

В экспериментах, выполненных по существу так же, как описано выше, Антитело 1 было способно связываться с экспрессируемым на клеточной мембране PD-1 человека или обезьяны яванский макак, со средним значением EC₅₀, равным 1,30 +/- 0,16 мкг/мл и 1,09 +/- 0,30 мкг/мл соответственно. Эти данные демонстрируют, что Антитело 1 способно связывать мембраносвязанный PD-1 как человека и обезьяны яванский макак, с одинаковой аффинностью.

Пример 3. Кинетика связывания Антитела 1/аффинность к ECD PD-1 человека и обезьяны яванский макак

Кинетика связывания агонистического антитела против PD-1 человека по данному изобретению с ECD PD-1 человека и обезьяны яванский макак может быть определена с помощью биосенсора в анализе поверхностного плазмонного резонанса, таком как 5 VIAcore[®]2000, VIAcore[®]3000, VIAcore[®] 8K, или VIAcore[®] T100 (GE Healthcare, Пискатауэй, штат Нью-Джерси). Вкратце, прибор VIAcore[®] 8K применяется для измерения кинетики связывания Антитела 1 с PD1-внеклеточным доменом (ECD)-His человека и обезьяны яванский макак посредством поверхностного плазмонного резонанса 10 (SPR) при 25 °С. Образцы растворяют в 1X HBS-EP + рабочий буфер (Teknova кат. № H8022) и белок А, связанный с сенсорным чипом CM5 серии S (GE Healthcare кат. № 29139131-AA), применяют для захвата mAb. Белки PD1-ECD человека и обезьяны яванский макак, которые содержат С-концевую 8х гистидиновую метку, экспрессируют в клетках CHO и очищают никель-заряженным IMAC с последующим исключением по 15 размеру.

Связывание оценивают с выполнением нескольких аналитических циклов. Каждый цикл выполняется при 25 °С при скорости потока 10 мкл/мин для захвата mAb и 30 мкл/мин - для ассоциации и диссоциации лиганда. Каждый цикл состоит из следующих этапов: введение mAb в количестве 2 мкг/мл в течение 60 с времени контакта с целью достичь уровня захвата приблизительно 220RUs в проточной ячейке 2, введение 20 в течение 150 секунд PD1-ECD-his человека или обезьяны яванский макак (диапазон концентрации от 400 нМ до 1,6 нМ при четырехкратном серийном разведении) с последующей 600-секундной фазой диссоциации и регенерацией с применением 10 мМ гидрохлорида глицина, рН 1,5, в течение 30-секундного времени контакта. Скорости 25 ассоциации (то есть K_{on}) и диссоциации (то есть K_{off}) для каждого цикла оценивают с применением стандартной двойной привязки и соответствия модели «связывания 1:1 (Ленгмюра)» при оценке ViaCore 8K в пакетном режиме параллельной кинетики. Аффинность (K_D) рассчитывают из кинетики связывания согласно соотношению $K_D = K_{off}/K_{on}$.

30 В последующих экспериментах ViaCore применяли для измерения кинетики связывания Антитела 1 с PD1-внеклеточным доменом (ECD)-His человека и обезьяны яванский макак с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37 °С посредством VIAcore[®] T200. Для анализов при 37 °С, связывание оценивают с применением множества аналитических циклов. Каждый цикл выполняется при 37 °С при

скорости потока 10 мкл/мин для захвата mAb и 100 мкл/мин для ассоциации и диссоциации лиганда. Каждый цикл состоит из следующих этапов: введение mAb в количестве 2,5 мкг/мл с целью достичь уровня захвата приблизительно 220RUs в проточной ячейке 2, введение в течение 180 секунд PD1-ECD-his человека или обезьяны яванский макак (диапазон концентрации от 1000 нМ до 1,6 нМ при двухкратном серийном разведении) с последующей 600-секундной фазой диссоциации и регенерацией с применением 10 мМ гидрохлорида глицина, pH 1,5, в течение 30-секундного времени контакта. K_{on} , K_{off} и KD рассчитываются по существу так, как описано выше. Данные по аффинности представлены в виде среднего значения и стандартных отклонений, определенных из трех измерений в трех независимых экспериментах (среднее \pm SD, n = 9).

В экспериментах, проведенных по существу так же, как описано выше, Антитело 1 связывается с PD1-ECD-his человека и обезьяны яванский макак, что определено посредством Biacore при 25 °C (n = 1) и при 37 °C (n = 9) и как продемонстрировано в Таблице 2.

Таблица 2. Кинетика и аффинность связывания антитела 1 с ECD PD-1

	Виды ECD PD-1	K_{on} (1/Мс)	K_{off} (1/с)	KD (нМ)
25 °C	Человек	1,7E + 05	1,7E-04	1,0
	Яванский макак	2,4E+05	1,1E-03	4,7
37 °C	Человек	$3,07 \pm 0,16 \times 10^5$	$7,01 \pm 0,92 \times 10^{-4}$	$2,29 \pm 0,36$
	Яванский макак	$5,19 \pm 0,52 \times 10^5$	$4,89 \pm 0,10 \times 10^{-3}$	$9,51 \pm 0,85$

Как показано в Таблице 2, Антитело 1 связывает ECD PD-1 как человека, так и обезьяны яванский макак с наномолярной аффинностью и демонстрирует сходную кинетику связывания для ECD PD-1 человека и обезьяны яванский макак.

Пример 4. Антитело 1 не блокирует связывание PD-1 с PD-L1 или PD-L2.

Способность антитела по данному изобретению блокировать связывание PD-1 с PD-L1 и PD-L2 можно определить следующим образом. Вкратце, стабильные клетки, экспрессирующие PD-1 человека, генерируют путем трансфекции плазмидной ДНК PD-1 человека в клетки CHO-k1 (Lonza) с помощью системы электропорации (Gene Pulser Xcell; BioRad) в соответствии с известными протоколами. Стабильные клетки отбирают из отдельных выделенных клеток, применяя для этого 500 мкг/мл G418 (Thermo Scientific) в культуральной среде. Тестируемые антитела к PD-1 в количестве 200 мкг/мл или начиная

с 100 мкг/мл с последующим 12-кратным 7-точечным титрованием антител в буфере FACS инкубируют при 4 °С в течение 30 минут. Клетки дважды промывают буфером FACS. Клетки ресуспендируют в 50 мкл буфера FACS с 20 мкг/мл биотинилированного PD-L1 человека (Acros, # PD-1-H82F3) или PD-L2 (Abcam, ab198764) и инкубируют при 4 °С в течение 30 минут. Клетки дважды промывают буфером FACS и ресуспендируют в 100 мкл буфера FACS со стрептавидином-APC (BD Biosciences, # 554067) в разведении 1:200 в буфере FACS и инкубируют при 4 °С в течение 30 минут. После двукратной промывки в буфере FACS, проводят окрашивание живых/мертвых клеток с применением SytoxBlue (Invitrogen, # S34857) в соответствии с протоколом производителя. Клетки обрабатывают на приборе для проточной цитометрии Fortessa, Fortessa Fx или LSRII. Данные проточной цитометрии анализируют с помощью программного обеспечения FlowJo. Значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) применяются для расчета относительного IC₅₀ на основе логистической регрессии с 4 параметрами.

В экспериментах, проведенных по существу так же, как описано выше, Антитело 1 и антитело изотипического контроля не блокировали связывание PD-L1 и PD-L2, при этом показатель IC₅₀ для антитела положительного контроля, специфического антагонистического антитела к PD-1 (гомолог ниволумаба), составлял 0,22 +/- 0,02 мкг/мл для PD-L1 и 0,42 +/- 0,12 мкг/мл для PD-L2. Эти данные демонстрируют, что Антитело 1 не блокирует связывание PD-1 с PD-L1 или PD-L2.

Пример 5. Антитело 1 ингибирует сигналинг NFAT, индуцированный активацией Т-клеток.

NFAT (Ядерный фактор активированных Т-клеток) является транскрипционным фактором, который играет важную роль в обеспечении активации рецептора Т-клеток к иммунному ответу путем модулирования экспрессии генов, кодирующих воспалительные цитокины, например, TNF, IL-2, а также нескольких рецепторов клеточной поверхности. Способность антител, описанных в данном документе, ингибировать сигналинг NFAT, индуцированный активацией Т-клеток, можно измерить следующим образом.

Описывая вкратце, Т-клетки Jurkat, трансфицированные как NFAT-люциферазным репортером, так и PD-1 человека (Promega), активируют антителом против CD3 человека и клетками ТНР-1 (АТСС®). Клетки ТНР-1 (40000 клеток/лунку) высевают в 100 мкл на белый 96-луночный планшет (Corning, # 3917). Два мкг/мл антитела против CD3 человека (ОКТ3) (eBioscience, # 16-0037) и терапевтических антител (Антитело 1 или антитело изотипического контроля) в конечной концентрации 20 мкг/мл или пятикратном 7-

точечном титровании антитела, начиная с количества 10 мкг/мл, добавляют к клеткам ТНР-1. Смеси клеток и антител инкубируют при 37 °С, 5% CO₂ в течение 30 минут.

Клетки Jurkat с NFAT-люциферазным репортером, экспрессирующие PD-1 (50000 клеток/лунку), добавляют к клеткам ТНР-1, антителам к CD3 и терепавтическим

5 антителам на 96-луночные планшеты и инкубируют при 37 °С, 5% CO₂ в течение 5 часов.

В конце инкубации планшеты доводят до комнатной температуры в течение 10 минут.

Восемьдесят (80) микролитров реагента BioGlo (Promega, # G7940) добавляют в лунки и инкубируют в течение 10 минут при комнатной температуре. Люминесценция готова с помощью LMaxII384 (Molecular Devices) или Envision 2105 (Perkin Elmer).

10 В экспериментах, проведенных по существу так же, как описано выше, Антитело 1 и антитело изотипического контроля ингибировали активность клетки человека с PD-1 и NFAT-люциферазным репортером со средним показателем IC₅₀ из четырех независимых экспериментов, равным 75,2 +/- 37,6 нг/мл, тогда как антитело изотипического контроля незначительно ингибировало сигналинг NFAT. Эти данные демонстрируют, что Антитело

15 1 способно ингибировать сигналинг NFAT, индуцированный активацией Т-клеток.

Пример 6. Антитело 1 ингибирует пролиферацию первичных Т-клеток человека

Способность антител, описанных в данном документе, ингибировать пролиферацию Т-клеток, индуцированную активацией рецепторов Т-клеток, можно

20 измерить следующим образом. Вкратце, мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК) выделяют из LRS Trima здорового человека (Банк крови Сан-Диего; Сан-Диего, штат Калифорния) с помощью метода центрифугирования в градиенте плотности Ficoll путем наложения 35 мл разбавленной крови (десятикратное разведение в PBS без кальция или магния в 15 мл среды Ficoll при 37 °С (Ficoll-Paque Plus, GE

25 Healthcare; # 17144002) в конических пробирках объемом 50 мл. Пробирки центрифугируют при комнатной температуре в течение 30 минут при 900xG. Поверхность раздела клеток переносят в новую коническую пробирку объемом 50 мл. Конечный объем доводят до 50 мл с помощью PBS комнатной температуры (без кальция или магния).

После двукратной промывки в PBS клетки ресуспендируют в полной среде CTS (Gibco, #

30 A1048501; # A10484-02).

Выделенные МКПК человека помечают с помощью CFSE (Biolegend, кат. № 79898). МКПК трижды промывают в бессывороточной среде RPMI. Мечение с помощью CFSE проводят в бессывороточной среде в присутствии 1 мкМ CFSE при 37 °С с 5% CO₂ в течение 20 минут. CFSE гасят полной средой CTS с последующим этапом промывки.

МКПК, меченные с помощью CFSE (150000 клеток/лунку), добавляют в каждую лунку с круглым дном 96-луночного планшета, содержащую Антитело 1 или антитело изотипического контроля. Клетки стимулируют с применением 4 нг/мл суперантигена (стафилококковый энтеротоксин, SEB) (Toxin Technologies BT2021MG) в течение 72 часов при 37 °C с 5% CO₂.

Планшеты после инкубации промывают буфером FACS (Miltenyi Biotec; # 130-091-221), инкубируют с реагентом, блокирующим Fc человека (Miltenyi Biotec, # 130-059-901) в течение 10 минут с последующим окрашиванием мечеными антителами против CD4 (Biolegend, # 317426) и PD-1 (eBioscience, # 17-2799-42) в течение 30 минут на льду. После промывки в буфере FACS, проводят окрашивание живых/мертвых клеток с применением SytoxBlue (Invitrogen, # S34857) в соответствии с протоколом производителя. Клетки обрабатывают на приборе для проточной цитометрии Fortessa X20 в присутствии гранул CountBright (Invitrogen, # C36950) для количественного определения числа клеток. Данные проточной цитометрии анализируют с помощью программного обеспечения FlowJo. Абсолютное количество делящихся CD4-позитивных клеток рассчитывают с посредством окрашивания CFSE и гранул CountBright.

В экспериментах, проведенных по существу так же, как описано выше, Антитело 1 было способно ингибировать пролиферацию первичных Т-клеток человека со средним показателем IC₅₀, составляющим 175 +/- 128 нг/мл для восьми различных доноров, тогда как антитело изотипического контроля не ингибировало пролиферацию первичных Т-клеток. Эти данные демонстрируют, что Антитело 1 способно ингибировать пролиферацию Т-клеток *in vitro*.

Пример 7. Исследования высвобождения цитокинов *in vitro*.

Целью данного исследования является проверка того, индуцирует ли Антитело 1 высвобождение цитокинов из нестимулированных МКПК человека.

Описывая вкратце, свежевыделенные МКПК от здоровых субъектов инкубируют со связанным с планшетом Антителом 1 или контрольными антителами в течение 24 часов в диапазоне титрования от 0,5 мкг до 1,5 мкг. Положительными контролями являются коммерчески доступное антитело против CD3ε человека, ОКТ3, и гомолог CD28-специфического суперагонистического терапевтического антитела, TGN1412. Известно, что оба антитела вызывают синдром высвобождения цитокинов, форму синдрома системного воспалительного ответа, которая может быть опасной для жизни. Отрицательный контроль представляет собой антитело изотипического контроля IgG1

дикого типа (WT) человека. С помощью коммерчески доступного мультиплексного анализа на основе платформы Mesoscale в супернатантах клеточных культур измеряют пять цитокинов, включая IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-10 и TNF- α .

5 В экспериментах, проводимых в основном так, как описано выше, инкубация МКПК человека с Антителом 1 не приводила к значительным уровням высвобождения цитокинов для IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-10 и TNF- α в концентрациях 0,5, 1 или 1,5 мкг/лунку. Напротив, инкубация МКПК с антителом анти-CD3 ϵ и антителом положительного контроля TGN1412 в количестве 1 мкг на лунку приводила к устойчивой продукции IL-2, IFN- γ , IL-10 и TNF- α у большинства доноров.

10

Пример 8. Модель реакции «трансплантат против хозяина» мыши (GVHD) *in vivo*

Гуманизированные мышинные модели ксеногенной GvHD, основанные на иммунодефицитных штаммах, инъецированных МКПК человека («мыши Nu-PBMC»), являются важными инструментами для изучения иммунной функции человека *in vivo*.

15 Способность антител, описанных в данном документе, защищать мышей от GvHD, оценивали на модели мышей Nu-PBMC.

Вкратце, самок мышей NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, JAX Labs, Stock # 05557) содержали по 3 на клетку при 72 °C при 12-часовом цикле «освещение:темнота» и разрешали прием еды и воды *ad libitum* (n = 78). МКПК человека выделяли из пробирок LRS, полученных от двух доноров (банк крови Сан-Диего), с использованием пробирок для приготовления SepMate 50 Ficoll в соответствии с инструкциями производителя (STEMCELL Technologies, Ванкувер, Британская Колумбия). Свежие выделенные МКПК суспендировали в PBS при $1,2 \times 10^8$ клеток/мл, и мышам вводили 100 μ мкл суспензии МКПК внутривенно в день 0 ($1,2 \times 10^7$ /мышь); 36 мышей получали МКПК от Донора 1, 25 36 от Донора 2, и 6 мышей оставались составили контрольную группу, которым не вводили суспензию. Идентичные протоколы впоследствии соблюдали для каждого донора. В день 1 мышей разделяли на четыре группы, соответствующие весу/донору, и подкожно вводили изотипический контроль или Антитело 1 в количестве 0,1, 1,0 или 10,0 мг/кг (200 мкг/мышь). Введение дозы продолжали два раза в неделю до конца 30 эксперимента. Проверку состояния здоровья и измерение веса тела мышей проводили регулярно. Мышей, которые теряли 20% своего начального веса или испытывали сильный дистресс, подвергают эвтаназии. Когда большинство мышей, получающих изотипический контроль, нуждались в эвтаназии из-за прогрессирования заболевания, всех мышей умерщвляли. У всех эвтаназированных мышей кровь собирали путем

пункции сердца под анестезией изофлураном в пробирки с ЭДТК для анализа FACS и очищали центрифугированием для анализа плазмы. Вес тела и клинические наблюдения. Мышей взвешивали в камере BSL2 и оценивали по клиническим признакам дистресса 2-3 раза в неделю. Клиническими признаками, общими для этой модели, являются

5 неухоженная шерсть, сгорбленное тело, истощение, а также затрудненное дыхание или движения. Изменение веса тела рассчитывали в процентах от их исходного показателя: (День (x) вес/День 0 вес)*100.

Анализ плазмы. Кровь в результате пункции сердца собирали в пробирки, содержащие ЭДТК, очищали центрифугированием, а полученную плазму хранили при -

10 80 °C для дальнейшей обработки. Плазменные цитокины измеряли с помощью системы Mesoscale Discovery Human Th1/Th2 10-Vplex (Роквилл, штат Мэриленд) в соответствии с инструкциями производителя.

Статистика. Собирали данные и рассчитывали статистику с помощью программного обеспечения Prism (GraphPad, Сан-Диего, штат Калифорния). Различия в

15 весе между группами определяли с применением двухфакторного анализа RM-ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Различия в терминальных уровнях цитокинов в плазме определяли с помощью однофакторного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Различия между исследуемыми группами считались достоверными, если $p < 0,05$.

В экспериментах, проведенных по существу так же, как описано выше,

20 трансплантация МКПК человека от Донора 1 или Донора 2 вызывала GvHD, о чем свидетельствовало заметное истощение у мышей NSG. Прогрессирование заболевания было более быстрым у мышей, которым трансплантировали МКПК Донора 2, по сравнению с Донором 1, с прекращением исследования из-за значительной потери веса на 26 и 40 дни, соответственно. Лечение Антителом 1 значительно замедляло

25 прогрессирование заболевания, что измерялось по снижению потери веса у мышей, которым трансплантировали материал любого из доноров. Кроме того, Антитело 1 ингибировало выраженное увеличение в плазме цитокинов Th1 (IFN- γ) и Th2 (IL-13) человека, ассоциированных с прогрессированием заболевания. Следовательно, Антитело 1 значительно снижает прогрессирование заболевания в гуманизированной модели GvHD.

30

Пример 9. Мышиная модель волчаночного нефрита «hPD-1 KI - Bm12 хроническая GvHD»

Хроническую GvHD (сGvHD), характеризующуюся развитием аутоантител и патологией, сходной с волчаночным нефритом человека, можно индуцировать у мышей

Bm12 путем инъекции спленоцитов от мышей-доноров, экспрессирующих PD-1 человека, на фоне C57BL/6. В исследовании, описанном в этом Примере 9, спленоциты от мышей hPD-1 KI (C57BL/6-Pdcd1^{tm1606.1}) инъецировали мышам B6(C)-H2-Ab1bm12/KhEgJ (Bm12) Впоследствии у мышей-хозяев развивалось медленно прогрессирующее SLE-подобное заболевание, характеризующееся развитием аутоантител против dsДНК и отложением иммунного комплекса в почках. Таким образом, активность агонистического антитела к PD-1 может быть оценена на этой модели волчаночного нефрита следующим образом.

Описывая вкратце, самцы мышей с нокином PD-1 (Taconic Laboratories) достигали возраста 9 недель после прибытия, а самцы мышей Bm12 (Jackson Laboratories) - 11 недель после прибытия. Всех мышей содержали по 4 на клетку и давали им акклиматизироваться в течение 1 недели до начала исследования. Мышей кормили кормом Teklad Global Rodent Diet 2014 (Harlan) и разрешали воду ad libitum. Мышей содержали при 12-часовом цикле «свет/темнота» при температуре окружающей среды, установленной на 68-79 °F. За четыре дня до начала исследования мышей случайным образом сортировали по весу тела, и отбирали 75 мкл цельной крови через насечку в хвосте. Сыворотку отделяли от цельной крови путем центрифугирования при 10000 об/мин в течение 5 минут и применяли для количественного определения титров анти-dsДНК. Затем мышей распределяли по следующим группам лечения: (1) 10,0 мг/кг изотипического контроля hIgG1, (2) 1,0 мг/кг Антитела 1, (3) 10,0 мг/кг Антитела 1. Мышам вводили подкожно изотипический контроль IgG1 человека или Антитело 1 дважды в неделю, начиная со Дня 0. Образцы сыворотки отбирали у мышей через насечку в хвосте каждые 2 недели до окончания исследования, через 42 дня после начала лечения.

Уровни анти-dsДНК в сыворотке измеряли с помощью специального ИФА. Планшеты (96 лунок) покрывали в течение ночи при 4 °C 10 мкг/мл ДНК тимуса теленка (R&D Systems). После промывки с помощью PBS-Tween (0,05%) добавляли 2 мкл образца (разведение 1:100) и серийно разводили 1:3. После 2-часовой инкубации при комнатной температуре планшеты промывали и добавляли козий антимишиный IgG (Jackson ImmunoResearch) в разведении 1:2000 в течение 90 минут. Планшеты промывали и добавляли Ultra-TMB (ThermoSci Pierce) в течение 15 минут и останавливали реакцию с помощью 1N H₂S₀₄. OD считывали при длине волны 450 нм и рассчитывали значения EC₅₀.

В экспериментах, проведенных по существу так же, как описано выше в Примере 9, аутоантитела против титров двухцепочной ДНК (анти-dsДНК) снижались при

обработке Антителом 1 дозозависимым образом в ходе исследования. При применении доз 1 мг/кг и 10 мг/кг Антитела 1, снижение уровней анти-dsДНК было статистически значимым по сравнению с контрольной группой изотипического контроля IgG1 человека в дни 28 и 42. Показатели AUC анти-dsДНК также снижались зависимо от дозы Антитела 1.

- 5 Антитело 1 в дозе 10 мг/кг было способно значительно снизить AUC анти-dsДНК по сравнению с изотипическим контролем IgG1 человека. Следовательно, Антитело 1 может значительно снизить прогрессирование заболевания в cGvHD-модели волчанки.

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности

Тяжелая цепь Антитела 1 (SEQ ID NO: 1)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYSLSKYDMSWVRQAPGKGLEWMGIIYTSGYT
5 DYAQKFQGRVTMTEDTSTDТАYMESSLRSEDТАVYYCATGNPYYTNGFNСWGGQTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGТАALGCLVKDYFPEPVTVSNСGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
10 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVФSСVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Легкая цепь Антитела 1 (SEQ ID NO: 2)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSPNLLAWYQQKPGKAPKLLIYGASDLPSGVPS
15 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNNYYVGPVSYAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDISTYSLSS
TLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Вариабельная область тяжелой цепи Антитела 1 (SEQ ID NO: 3)

20 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYSLSKYDMSWVRQAPGKGLEWMGIIYTSGYT
DYAQKFQGRVTMTEDTSTDТАYMESSLRSEDТАVYYCATGNPYYTNGFNСWGGQTL
VTVSS

Вариабельная область легкой цепи Антитела 1 (SEQ ID NO: 4)

25 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSPNLLAWYQQKPGKAPKLLIYGASDLPSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNNYYVGPVSYAFGGGTKVEIK

HCDR1 Антитела 1 (SEQ ID NO: 5)

KVSGYSLSKYDMS

30

HCDR2 Антитела 1 (SEQ ID NO: 6)

IIYTSGYTDYAQKFQG

HCDR3 Антитела 1 (SEQ ID NO: 7)

ATGNPYYTNGFNS

LCDR1 Антитела 1 (SEQ ID NO: 8)

QASQSPNNLLA

5

LCDR2 Антитела 1 (SEQ ID NO: 9)

YGASDLPS

LCDR3 Антитела 1 (SEQ ID NO: 10)

10 QNNYYVGPVSYA

ДНК, кодирующая тяжелую цепь Антитела 1 (SEQ ID NO: 11)

caagtgcagttggtgcagtcgggggcagaagtgaaaaagcccggcgcttcggtgaaagtgcctgcaaagtgtccgctattctttgtcca
aatacgcacatgtcatgggtcagacaggctcccggaaagggtctggagtggatggggattatctatacatccggctacaccgattacgcca
15 aaagtccaggggagagtcaccatgactgaggatactccaccgacaccgcctacatggaactgtccagcctgcggtccgaggacactg
cggtgtactactgcgcgaccggaaaccatactacaccaatggattcaatagctggggacagggctactctgtgacgggtccagcgcctc
caccaagggcccatcggctctccgctagcacctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtaaggact
acttccccgaaccgggtgacgggtgctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtcctacagtccctcaggact
ctactccctcagcagcgtggtgacctgacctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaactgaaatcacaagcccagcaaac
20 caaggtggacaagaaagttgagcccaatcttgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtc
agtcttctcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaa
gacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtacaacagca
cgtaccgtgtggtcagcgtcctaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagccctcc
cagccccatcgagaaaacctctcaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggacgagct
25 gaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgg
agaacaactacaagaccacgcccccgctggactccgacggctccttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggc
agcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgagaagagcctctcctgtctccgggtaaa

ДНК, кодирующая легкую цепь Антитела 1 (SEQ ID NO: 12)

30 gacatccagatgaccagctcctcctctctgctgcatctgtgggagacagagtcaccatcacttgccaggccagtcagagccctaataa
cctcctggcctggtatcagcagaaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatggtgcatccgatctgccatctggggctccatcaaggt
tcagtggcagtggtatctgggacagattcactctcaccatcagcagctgcaacctgaagatttgcaacttactactgtcagaacaattattat
gtgggaccagtgagctatgcttccggcgaggggaccaaggtggagatcaagcggaccgtggctgaccatctgtcttcatcttcccgccat
ctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctggtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtaagtggaaggtggata

acgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagaccctgacgct
gagcaaaagcagactacgagaaacacaaaagtctacgcctgcgaagtacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaaca
ggggagagtgc

5 **Аминокислотная последовательность PD-1 человека (SEQ ID NO: 13)**

MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSN
TSEFVLNWyRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRN
DSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPPRPAGQFQTLVVG VGG
10 LLGSLVLLVWVLA VICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTP
EPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

Аминокислотная последовательность ECD PD-1 человека (SEQ ID NO: 14)

15 LDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSEFVLNWyRMSPSNQTDKLAAPPE
DRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELR
VTERRAEVPTAHPSPPRPAGQFQ

20 **Аминокислотная последовательность PD-1 обезьяны яванский макак (SEQ ID NO: 15)**

MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLESPDRPWNAPTFSPALLLVTEGDNATFTCSFSN
ASEFVLNWyRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTRLPNGRDFHMSVVRARRN
DSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPPRPAGQFQALVVG VGG
25 LLGSLVLLVWVLA VICSRAAQGTIEARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTP
EPPAPCVPEQTEYATIVFPSGLGTSSPARRGSADGPRSPRPLRPEDGHCSWPL

30 **Аминокислотная последовательность ECD PD-1 обезьяны яванский макак (SEQ ID NO: 16)**

LESPDRPWNAPTFSPALLLVTEGDNATFTCSFSNASEFVLNWyRMSPSNQTDKLAAPPE
DRSQPGQDCRFRVTRLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELR
VTERRAEVPTAHPSPPRPAGQFQ

35 **Аминокислотная последовательность IgG1 человека (SEQ ID NO: 17):**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK

EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

Аминокислотные последовательности каппа дикого типа человека (SEQ ID NO: 18)

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTARVGGCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSRSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

10

Аминокислотная последовательность лямбда дикого типа человека (SEQ ID NO: 19)

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK
AGVETTTPSKQSNNKYAAESELSTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV

15

VAPTECS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывает PD-1 человека, содержащее: 1) переменную область тяжелой цепи (HCVR); и 2) переменную область легкой цепи (LCVR), при этом HCVR содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, а LCVR содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, при этом аминокислотная последовательность HCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 5, аминокислотная последовательность HCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 6, а аминокислотная последовательность HCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 7, аминокислотная последовательность LCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 8, аминокислотная последовательность LCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 9, а аминокислотная последовательность LCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 10, и при этом указанное антитело представляет собой IgG1.
2. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что аминокислотная последовательность HCVR представляет собой SEQ ID NO: 3, а аминокислотная последовательность LCVR представляет собой SEQ ID NO: 4.
3. Антитело по п. 2, содержащее: 1) HC; и 2) LC, при этом аминокислотная последовательность HC представляет собой SEQ ID NO: 1, а аминокислотная последовательность LC представляет собой SEQ ID NO: 2.
4. Антитело по п. 3, содержащее две HC и две LC, при этом аминокислотная последовательность каждой из HC представляет собой SEQ ID NO: 1, а аминокислотная последовательность каждой из LC представляет собой SEQ ID NO: 2.
5. Антитело по любому из пп. 1 - 4, отличающееся тем, что указанное антитело является агонистом PD-1 человека, как определено в модели аутоиммунного нарушения или отторжения трансплантата *in vivo*.
6. Антитело по п. 5, отличающееся тем, что указанная модель *in vivo* представляет собой модель для GVHD, отторжения трансплантированного твердого органа, васкулита, SLE, T1DM, MS, GCA, PsO, PsA, RA, IBD, UC, AS, SjS, аутоиммунного гепатита или склеродермии.

7. Антитело по п. 5, отличающееся тем, что указанная модель *in vivo* представляет собой мышиную модель для GVHD и/или волчаночного нефрита.
- 5 8. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1 - 7 и один или большее количество фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.
9. Способ лечения аутоиммунного заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела по любому из пп. 1 - 7.
- 10 10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанное аутоиммунное заболевание представляет собой GVHD, отторжение трансплантированного твердого органа, васкулит, SLE, T1DM, MS, GCA, PsO, PsA, RA, IBD, UC, AS, SjS, аутоиммунный гепатит, склеродерму, целиакию, болезнь Аддисона, болезнь Хашимото, болезнь Грейвса, атрофический гастрит/пернициозную анемию, приобретенный гипогонадизм/бесплодие, гипопаратиреоз, 15 позитивно-гемолитическую анемию Кумбса, хронические аллергические заболевания (такие как астма, сенная лихорадка или аллергический ринит), болезнь Крона, мужское или женское бесплодие, болезнь Бехчета, гранулематоз Вегенера, миокардит, миозит, PMR, самопроизвольный аборт, 20 витилиго, атеросклероз, аутоиммунный панкреатит, буллезный пемфигоид, хронические вирусные инфекции или миастению гравис.
11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что указанное аутоиммунное заболевание представляет собой GVHD, отторжение трансплантированного твердого органа, васкулит, SLE, T1DM, MS, GCA, PsO, PsA, RA, IBD, UC, 25 AS, SjS, аутоиммунный гепатит или склеродермию.
12. Способ по любому из пп. 9 - 11, отличающийся тем, что указанное антитело вводят в комбинации с другим терапевтическим агентом, эффективным для лечения аутоиммунного заболевания.
13. Антитело по любому из пп. 1 - 7 для применения в терапии.
- 30 14. Антитело по любому из пп. 1 - 7 для применения в лечении аутоиммунного заболевания.
15. Антитело для применения по п. 14, отличающееся тем, что указанное аутоиммунное заболевание представляет собой GVHD, отторжение трансплантированного твердого органа, васкулит, SLE, T1DM, MS, GCA,

- PsO, PsA, RA, IBD, UC, AS, SjS, аутоиммунный гепатит, склеродерму, целиакию, болезнь Аддисона, болезнь Хашимото, болезнь Грейвса, атрофический гастрит/пернициозную анемию, приобретенный гипогонадизм/бесплодие, гипопаратиреоз, позитивно-гемолитическую анемию Кумбса, хронические аллергические заболевания (такие как астма, сенная лихорадка или аллергический ринит), болезнь Крона, мужское или женское бесплодие, болезнь Бехчета, гранулематоз Вегенера, миокардит, миозит, PMR, самопроизвольный аборт, витилиго, атеросклероз, аутоиммунный панкреатит, буллезный пемфигоид, хронические вирусные инфекции или миастению гравис.
- 5
- 10
16. Антитело для применения по п. 15, отличающееся тем, что указанное аутоиммунное заболевание представляет собой GVHD, отторжение трансплантированного твердого органа, васкулит, SLE, T1DM, MS, GCA, PsO, PsA, RA, IBD, UC, AS, SjS, аутоиммунный гепатит или склеродермию.
- 15
17. Антитело для применения по любому из пп. 14 - 16, отличающееся тем, что указанное антитело вводят в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с другим терапевтическим агентом, эффективным для лечения аутоиммунного заболевания.
- 20
18. Применение антитела по любому из пп. 1 - 7 для изготовления лекарственного средства для лечения аутоиммунного заболевания.
- 25
19. Применение по п. 18, отличающееся тем, что указанное аутоиммунное заболевание представляет собой GVHD, отторжение трансплантированного твердого органа, васкулит, SLE, T1DM, MS, GCA, PsO, PsA, RA, IBD, UC, AS, SjS, аутоиммунный гепатит, склеродерму, целиакию, болезнь Аддисона, болезнь Хашимото, болезнь Грейвса, атрофический гастрит/пернициозную анемию, приобретенный гипогонадизм/бесплодие, гипопаратиреоз, позитивно-гемолитическую анемию Кумбса, хронические аллергические заболевания (такие как астма, сенная лихорадка или аллергический ринит), болезнь Крона, мужское или женское бесплодие, болезнь Бехчета, гранулематоз Вегенера, миокардит, миозит, PMR, самопроизвольный аборт, витилиго, атеросклероз, аутоиммунный панкреатит, буллезный пемфигоид, хронические вирусные инфекции или миастению гравис.
- 30
20. Применение по п. 19, отличающееся тем, что указанное аутоиммунное заболевание представляет собой GVHD, отторжение трансплантированного

твёрдого органа, васкулит, SLE, T1DM, MS, GCA, PsO, PsA, RA, IBD, UC, AS, SjS, аутоиммунный гепатит или склеродермию.

- 5 21. Применение по любому из пп. 18 - 19, отличающееся тем, что указанное антитело вводят в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с другим терапевтическим агентом, эффективным для лечения аутоиммунного заболевания.