

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **041843**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- |   |   |
|---|---|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента<br/><b>2022.12.08</b></p> <p>(21) Номер заявки<br/><b>201990672</b></p> <p>(22) Дата подачи заявки<br/><b>2017.09.08</b></p> | <p>(51) Int. Cl. <b>C07K 16/28</b> (2006.01)<br/><b>A61K 47/68</b> (2017.01)<br/><b>A61K 39/395</b> (2006.01)<br/><b>A61P 37/02</b> (2006.01)<br/><b>A61P 35/00</b> (2006.01)<br/><b>A61P 19/02</b> (2006.01)</p> |
|---|---|

(54) **АНТИТЕЛО, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩЕЕСЯ С PD-1, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ**

- |  |   |
|--|---|
| <p>(31) <b>201610827099.1</b></p> <p>(32) <b>2016.09.14</b></p> <p>(33) <b>CN</b></p> <p>(43) <b>2019.08.30</b></p> <p>(86) <b>PCT/CN2017/101082</b></p> <p>(87) <b>WO 2018/050027 2018.03.22</b></p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:<br/><b>БЭЙЦЗИН ХАНМИ ФАРМ. КО., ЛТД.</b><br/><b>(CN)</b></p> <p>(72) Изобретатель:<br/><b>Ян Япин, Лю Цзяван, Сун Наньмэн,</b><br/><b>Чжан Хунцзюань, Цзинь Мэнсе (CN)</b></p> <p>(74) Представитель:<br/><b>Медведев В.Н. (RU)</b></p> | <p>(56) <b>WO-A8-2015112900</b><br/><b>WO-A1-2015085847</b></p> |
|--|---|

- (57) Предложены антитело, специфически связывающееся с PD-1, и его функциональный фрагмент. Предложены также молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая указанные антитело или фрагмент, их конъюгат с терапевтическим средством и фармацевтическая композиция для предотвращения или лечения заболевания, при котором экспрессируется PD-1, на их основе, а также применения указанных антитела, конъюгата и композиции в предотвращении или лечении опухоли, при которой экспрессируется PD-1.

**B1**

**041843**

**041843**  
**B1**

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с заявкой на выдачу патента Китая № CN201610827099.1, поданной 14 сентября 2016 года в государственное ведомство по интеллектуальной собственности и озаглавленной "Antibody Specifically Binding to PD-1 and Functional Fragment Thereof", полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

#### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к области медицинской биотехнологии и исследованиям в области инженерии гуманизированных антител, и в частности к антителам, специфически связывающимся с PD-1, и их функциональным фрагментам.

#### **Уровень техники**

Белок программируемой смерти 1 (PD-1) является недавно предложенной иммунной контрольной точкой, вовлеченной в регуляцию активации Т-клеток, которая может регулировать силу и продолжительность иммунных ответов. В нормальных условиях PD-1 может опосредовать и поддерживать аутоиммунную толерантность организма и предотвращать излишнюю активацию иммунной системы во время воспалительной реакции, которая вызывает повреждение тканей, что положительно влияет на предотвращение возникновения аутоиммунных заболеваний. В патологических условиях PD-1 вовлечен в противоопухолевый иммунитет, а также в возникновение и развитие разных аутоиммунных заболеваний (Anticancer Agents Med Chem. 2015; 15(3):307-13. Hematol Oncol Stem Cell Ther. 2014 Mar; 7(1): 1-17. Trends Mol Med. 2015 Jan; 21(1):24-33. Immunity. 2013 Jul 25; 39(1): 61-73. J Clin Oncol. 2015 Jun 10; 33(17): 1974-82).

PD-1 относится к семейству CD28. Но в отличие от других элементов семейства CD28, таких как CTLA4, которые могут образовывать ковалентный димер, связанный дисульфидной связью, PD-1 существует в виде мономера. Структура PD-1 в основном содержит внеклеточный домен наподобие вариационной области иммуноглобулина, гидрофобную трансмембранную область и внутриклеточную область, а внутриклеточная область имеет два независимых участка фосфорилирования, то есть, иммунорецепторный тирозинный ингибирующий мотив и иммунорецепторный тирозинный переключающий мотив, соответственно. Экспрессия PD-1 является индуцируемой и происходит в основном на поверхности активированных Т-клеток, а также В-клеток, NK-клеток, моноцитов и DC-клеток. Лиганд PD-1 включает PD-L1 (лиганд программируемой смерти 1), PD-L2 (лиганд программируемой смерти 2), и лиганды относятся к семейству B7. PD-L1 могут индуцироваться и экспрессироваться на поверхностях разных иммунных клеток, включая Т-клетки, В-клетки, моноциты, макрофаги, DC-клетки и эндотелиальные клетки, эпидермальные клетки, и т.д., в то время как PD-L2 могут индуцироваться и экспрессироваться на некоторых иммунных клетках, включая макрофаги, DC-клетки, В-клетки (Autoimmun Rev, 2013, 12(11): 1091-1100; Front Immunol, 2013, 4: 481. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 252-264; Trends Mol Med. 2015 Jan; 21 (1): 24-33).

В исследованиях опухолей было обнаружено, что PD-L1 экспрессируется на высоком уровне на поверхностях клеток множества опухолей, включая меланому, рак легких, рак почек, рак молочной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак пищевода, рак желудка, рак поджелудочной железы и рак желудочно-кишечного тракта, в то время как PD-L2 экспрессируется на высоком уровне на поверхностях клеток В-клеточной лимфомы. За счет экспрессии на высоком уровне PD-L1 или PD-L2 опухолевые клетки связываются с PD-1 на Т-клетках и передают иммуносупрессивные сигналы, приводящие к иммунной толерантности организма к опухолевым клеткам, что полезно для роста и метастазирования опухолевых клеток. Экспрессия на высоком уровне лиганда PD-1 тесно связана с неблагоприятным прогнозом и резистентностью к лекарственным средствам у онкологических пациентов (Hematol Oncol Stem Cell Ther., 2014 Mar; 7(1): 1-17). Кроме того, в исследованиях также обнаружено, что экспрессия с повышенной регуляцией PD-1 на поверхности Т-клеток, особенно на поверхности Т-клеток, проникших внутрь опухолевых клеток, также тесно связана с неблагоприятным прогнозом (Trends Mol Med., 2015 Jan; 21(1): 24-33).

В настоящее время особое внимание уделяется разработке антител, которые блокируют путь передачи сигналов PD-1/PD-Ls для борьбы с опухолями. Клинически, блокирующие PD-1/PD-Ls антитела обладают двумя четкими признаками: во-первых, эффективность не ограничена определенным типом опухоли, имеется сильная и продолжительная противоопухолевая эффективность к большому спектру опухолей, так как в клиническую оценку вовлекают все больше и больше типов опухолей, этот признак будет подвергаться дальнейшей проверке. Во-вторых, безопасность этих антител достаточно хорошая, и имеются только некоторые связанные с иммунитетом побочные эффекты, вместо обычных побочных эффектов некоторых химиотерапевтических препаратов и препаратов направленного действия, таких как усталость, уменьшение лейкоцитов, облысение, диарея и сыпь. Для лечения прогрессирующей меланомы, немелкоклеточного рака легких и почечно-клеточного рака на рынок поставляется Ниволумаб, антитела против PD-1, а для лечения прогрессирующей меланомы и немелкоклеточного рака легких на рынок поставляется Пембролизумаб. Проблема, на которую стоит обратить внимание, состоит в том, что нынешняя хорошая противоопухолевая эффективность блокирующих PD-1/PD-Ls антител может быть полезна только небольшому числу пациентов, у большинства пациентов есть врожденная резистентность к лекарственным средствам, или будет развиваться вторичная резистентность к лекарственным средствам (Oncology (Williston Park), 2014 Nov; 28 Suppl 3: 15-28).

Принимая это во внимание было специально предложено настоящее раскрытие.

### Сущность изобретения

Настоящее раскрытие основано на полученных исходных мышиных моноклональных антителах против PD-1 человека, обладающих способностью специфически связываться с белком PD-1 человека, путем клонирования, идентификации и анализа структуры гена для определения его области CDR, конструирования соответствующих химерных антител и гуманизированных антител, создания соответствующей экспрессирующей системы эукариотических клеток и получения и очистки химерных антител и гуманизированных антител.

Для достижения упомянутой выше цели настоящего раскрытия специально приняты следующие технические решения:

антитела, способные специфически связываться с PD-1, и их функциональные фрагменты, при этом антитело или функциональный фрагмент содержит легкую цепь и тяжелую цепь;

легкая цепь содержит CDR легкой цепи, состоящую из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3; тяжелая цепь содержит CDR тяжелой цепи, состоящую из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3;

аминокислотные последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 1, 5 и 6 или, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 2, 5 и 6 или, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 3, 5 и 6 или, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 4, 5 и 6; аминокислотные последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 7, 8 и 9.

Предпочтительно антитело или его функциональный фрагмент включает химерное антитело против PD-1 и его функциональный фрагмент и гуманизированное антитело против PD-1 и его функциональный фрагмент. То есть, это можно интерпретировать так, что антитело или его функциональный фрагмент включает химерное антитело против PD-1 и его функциональный фрагмент, или антитело или его функциональный фрагмент включает гуманизированное антитело против PD-1 и его функциональный фрагмент.

В данной области хорошо известно, что как специфичность, так и аффинность связывания антитела в основном определяются CDR, а аминокислотную последовательность области, не являющейся CDR, можно легко изменить в соответствии с хорошо известными существующими технологиями получения варианта, обладающего похожей биологической активностью. Согласно настоящему раскрытию варианты моноклональных антител имеют последовательности CDR, идентичные последовательностям CDR упомянутых выше гуманизированных антител, таким образом, они обладают похожей биологической активностью.

Предпочтительно антитело и его функциональный фрагмент, которые описаны выше, при этом антитело содержит любую последовательность константной области, выбранную из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE и IgD человека.

Предпочтительно антитело и его функциональный фрагмент, которые описаны выше, при этом функциональный фрагмент содержит одно или более, выбранное из группы, состоящей из F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv, scFv, минимальной единицы распознавания биспецифическими антителами и антителами.

"Функциональный фрагмент" согласно настоящему раскрытию относится конкретно к фрагменту антитела, имеющему такую же специфичность против PD-1, как специфичность исходного антитела. В дополнение к упомянутым выше функциональным фрагментам также можно включить любой фрагмент, у которого был увеличен период полувыведения.

scFv (sc=одноцепочечные), биспецифические антитела (диатела).

Эти функциональные фрагменты обычно имеют такую же специфичность связывания как у антител, из которых они получены. Рядовой специалист в данной области может узнать из изложенного в описании настоящего раскрытия об этом фрагменте антитела согласно настоящему раскрытию и получить фрагмент с упомянутой выше функцией посредством такого способа, как ферментативное расщепление (включая пепсин или папаин), и/или способа химического восстановления расщепленных дисульфидных связей.

Фрагменты антител также можно получить посредством пептидного синтеза с помощью рекомбинантных генетических методов, которые также известны рядовым специалистам в данной области, или с помощью автоматических синтезаторов пептидов, таких как автоматический синтезатор пептидов, поставляемый, например, Applied BioSystems.

Предпочтительно антитело и его функциональный фрагмент, которые описаны выше, при этом аминокислотные последовательности вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи химерного антитела против PD-1 или его функционального фрагмента, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 14 или, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 14 или, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 14 или, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14.

Кроме того, предпочтительно антитело и его функциональный фрагмент, которые описаны выше, при этом аминокислотные последовательности константной области легкой цепи и константной области тяжелой цепи химерного антитела против PD-1 или его функционального фрагмента, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16.

Предпочтительно антитело и его функциональный фрагмент, которые описаны выше, при этом кар-

касная область легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента содержит FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, а каркасная область тяжелой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента содержит FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4;

FR-L1 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 17, и аминокислотной последовательности, имеющей следующие замещения или их комбинации:

- 1-я аминокислота D заменена на E,
- 2-я аминокислота V заменена на I,
- 13-я аминокислота L заменена на V,
- 19-я аминокислота A заменена на V;

FR-L2 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 18, и аминокислотной последовательности, имеющей следующие замещения или их комбинации:

- 6-я аминокислота P заменена на S,
- 7-я аминокислота G заменена на H,
- 9-я аминокислота A заменена на S;

FR-L3 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 19, и аминокислотной последовательности, имеющей следующие замещения или их комбинации:

- 22-я аминокислота L заменена на V,
- 24-я аминокислота P заменена на T,
- 28-я аминокислота A заменена на G,
- 31-я аминокислота F заменена на Y;

FR-L4 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 20, и аминокислотной последовательности, имеющей следующие замещения или их комбинации:

- 7-я аминокислота V заменена на L;

FR-H1 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 21;

FR-H2 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 22, и аминокислотной последовательности, имеющей следующие замещения или их комбинации:

- 5-я аминокислота A заменена на T,
- 14-я аминокислота A заменена на S;

FR-H3 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 23, и аминокислотной последовательности, имеющей следующие замещения или их комбинации:

- 12-я аминокислота N заменена на T,
- 14-я аминокислота Y заменена на H,
- 18-я аминокислота N заменена на S;

FR-H4 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 24.

Обычно при трансплантации CDR мышинового антитела в каркасную область человека выбор каркасной области человека с высокой гомологией последовательностей будет иметь определенный показатель успеха. Однако исследования показали, что для восстановления определенной активности антитела многим трансплантатам CDR требуется обратная мутация. Большой проблемой является выбор правильной каркасной области у являющегося источником человека.

CDR является главным релевантным участком для связывания антигена, но в большинстве случаев FR (каркасная область) оказывает существенное влияние на конформацию участка связывания. Для того, чтобы получить гуманизованное антитело с высокой аффинностью согласно настоящему раскрытию, выбирают подходящую FR область, а релевантный остаток FR возвращают назад в исходную мышиную аминокислоту или аминокислоту, имеющуюся у человека и обладающую такой же функцией.

Предпочтительно последовательностью вариабельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента является последовательность, выбранная из SEQ ID NO: 25-36;

предпочтительно последовательностью вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента является последовательность, выбранная из SEQ ID NO: 37-42;

более предпочтительно последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 25; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 37;

альтернативно, последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 25; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 38;

альтернативно, последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 29; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 38;

альтернативно, последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 30; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 38;

альтернативно, последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 31; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 38;

альтернативно, последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 26; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 38;

альтернативно, последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 28; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 40;

альтернативно, последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 25; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 40;

альтернативно, последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 29; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 40;

альтернативно, последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 30; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 40;

альтернативно, последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 31; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 40;

альтернативно, последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 28; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 38;

альтернативно, последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 27; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 39;

альтернативно, последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 32; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 39;

альтернативно, последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 33; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 39;

альтернативно, последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 34; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 39;

альтернативно, последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 35; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 41;

альтернативно, последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 36; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 42;

более предпочтительно аминокислотные последовательности из последовательности константной области легкой цепи и последовательности константной области тяжелой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показаны в SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16, соответственно.

Необходимо заметить, что в дополнение к упомянутым выше аминокислотным последовательностям согласно настоящей заявке, получения химерных антител и гуманизованных антител можно добиться любым способом, известным рядовым специалистам в данной области, например, путем получения рекомбинантного гуманизованного антитела на основе секвенированных CDR мышинных антител, мышинное антитело секретируется миеломными клетками иммунизированных мышей или миеломными клетками, слитыми со спленоцитами других видов, которые слиты с миеломными клетками. Иммунизированным животным может быть трансгенная мышь, имеющая локус иммуноглобулина человека, которая может непосредственно вырабатывать антитело человека. Еще один возможный вариант осуществления может включать в себя скрининг библиотеки с использованием технологии фагового дисплея.

Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которую выбирают из:

А) ДНК или РНК, кодирующей антитело и его функциональный фрагмент, которые описаны выше;

и

В) нуклеиновой кислоты, комплементарной нуклеиновой кислоте согласно А).

Вектор, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая описана выше.

В настоящем раскрытии кроме того предоставлена по меньшей мере одна ядерная конструкция, кодирующая молекулу нуклеиновой кислоты, которая описана выше, предпочтительно вектор, более пред-

почтительно вектор экспрессии, такой как плаزمид, который описан в одном варианте осуществления настоящей заявки.

Клетка-хозяин, которую трансформируют описанным выше вектором.

Клеткой-хозяином является эукариотическая клетка, например, клетка млекопитающего.

Способ получения антител, способных специфически связываться с PD-1, и их функциональных фрагментов включает следующие этапы:

культивирование описанных выше клеток-хозяев в среде и в подходящих условиях культивирования; и

извлечение полученного антитела и его функциональных фрагментов из культуральной среды или из культивируемых клеток-хозяев.

Композиция, которая в качестве активного ингредиента содержит антитела и/или их функциональные фрагменты или состав из антител и других компонентов или состав из функциональных фрагментов антител и других компонентов.

Предпочтительно описанную выше композицию, антитело и его функциональный фрагмент соединяют по меньшей мере с одним диагностическим средством и/или терапевтическим средством с образованием иммуноконъюгата.

Предпочтительно диагностическим средством является одно или более, выбранное из группы, состоящей из радионуклида, радиоактивного контрастного средства, парамагнитного иона, металла, флуоресцентной метки, хемилюминесцентной метки, ультразвукового контрастного средства и фотосенсибилизатора.

Предпочтительно радионуклидом является одно или более, выбранное из группы, состоящей из  $^{110}\text{In}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{94}\text{mTc}$ ,  $^{94}\text{Tc}$ ,  $^{99}\text{mTc}$ ,  $^{120}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{154-158}\text{Gd}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{51}\text{Mn}$ ,  $^{52}\text{mMn}$ ,  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{82}\text{mRb}$  и  $^{83}\text{Sr}$ .

Предпочтительно парамагнитным ионом является одно или более, выбранное из группы, состоящей из хрома (III), марганца (II), железа (III), железа (II), кобальта (II), никеля (II), меди (II), неодима (III), самария (III), иттербия (III), гадолиния (III), ванадия (II), тербия (III), диспрозия (III), гольмия (III) и эрбия (III).

Предпочтительно флуоресцентной меткой является одно или более, выбранное из группы, состоящей из Alexa 350, Alexa 405, Alexa 430, Alexa 488, Alexa 555, Alexa 647, AMCA, аминокридина, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, 5-карбокситетраметилпродамина, 5'-дихлор-2', 7'-диметоксифлуоресцеина, 5-карбокситетраметилпродамина, 5-карбокситетраметилпродамина, 5-карбокситетраметилпродамина, Cascade Blue, Cy2, Cy3, Cy5, Cy7, 6-FAM, дансилхлорида, флуоресцеина, HEX, 6-JOE, NBD (7-нитробензо-2-окса-1,3-диазола), Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, фталевой кислоты, терефталевой кислоты, изофталевой кислоты, крезолового прочного фиолетового, крезолового фиолетового, бриллиантового крезолового голубого, 4-аминобензойной кислоты, эритрозина, фталоцианина, азометина, цианина, ксантина, сукцинилфлуоресцеина, криптата редкоземельного металла, трибипридилдиаминоксима, соединения криптата европия или хелата, диамина, дицианина, красителя голубой La Jolla, аллофикоцианина, аллокоцианина B, фикоцианина C, фикоцианина R, тиамина, R-фикоэритрина, C-фикоцианина, фикоэритрина R, REG, родамина зеленого, родамина изотиоцианата, родамина красного, ROX, TAMRA, TET, TRIT (тетраметилпродамина изотиола), тетраметилпродамина и техасского красного.

Предпочтительно терапевтическим средством является одно или более, выбранное из группы, состоящей из голого антитела, цитотоксического средства, лекарственного препарата, радионуклида, атома бора, иммуномодулятора, антиапоптотического средства, фотосенсибилизирующего терапевтического средства, иммуноконъюгата и олигонуклеотида.

Предпочтительно лекарственным препаратом является одно или более, выбранное из группы, состоящей из метотрексата, фторурацила, меркаптопурина, гидроксимочевины, цитарабина, азотистого иприта, циклофосфамида, тиотепы, цисплатина, митомицина, блеомицина, камптотецина, подофиллотоксина, актиномицина D, доксорубицина, даунорубицина, винбластина, паклитаксела, алкалоидов голубчатого тиса и L-аспарагиназы.

Предпочтительно олигонуклеотидом является одно или более, выбранное из группы, состоящей из shRNA, miRNA и siRNA.

Предпочтительно иммуномодулятором является одно или более, выбранное из группы, состоящей из цитокина, хемокина, фактора роста стволовых клеток, лимфотоксина, гематопоэтического фактора, колониестимулирующего фактора (CSF), интерферона, эритропоэтина, тромбопоэтина, фактора некроза опухоли (TNF), интерлейкина (IL), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и фактора роста стволовых клеток.

При этом цитокином предпочтительно является одно или более, выбранное из группы, состоящей из гормона роста человека, гормона роста человека N-метионила, гормона роста крупного рогатого скота, паратироидного гормона, тироксина, инсулина, проинсулина, релаксина, прорелаксина, фолликуло-

стимулирующего гормона (FSH), тиреостимулирующего гормона (TSH), лютеинизирующего гормона (LH), гепатоцитарного фактора роста, простагландина, фактора роста фибробластов, пролактина, плацентарного лактогена, белка OB, фактора некроза опухоли  $\alpha$ , фактора некроза опухоли  $\beta$ , ингибитора Мюллера, родственного гонадотропину пептида мыши, ингибина, активина, фактора роста эндотелия сосудов, интегрина, тромбопоэтина (TPO), NGF- $\beta$ , фактора роста тромбоцитов, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , инсулиноподобного фактора роста-1, инсулиноподобного фактора роста-11, эритропоэтина (EPO), остеоиндуктивного фактора, интерферона- $\alpha$ , интерферона- $\rho$ , интерферона- $\gamma$ , макрофага-CSF (M-CSF), IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-25, LIF, FLT-3, ангиостатина, тромбоспондина, эндостатина, фактора некроза опухоли и LT.

Хемокином предпочтительно является одно или более, выбранное из группы, состоящей из RANTES, MCAF, MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$  и IP-10.

Предпочтительно радионуклидом является одно или более, выбранное из группы, состоящей из  $^{111}\text{In}$ ,  $^{111}\text{At}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{211}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{133}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{152}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Dy}$ ,  $^{161}\text{Ho}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{189}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{77}\text{As}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{99}\text{Mo}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{194}\text{Ir}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{80}\text{mBr}$ ,  $^{99}\text{mTc}$ ,  $^{103}\text{mRh}$ ,  $^{109}\text{Pt}$ ,  $^{119}\text{Sb}$ ,  $^{189}\text{mOs}$ ,  $^{192}\text{Ir}$ ,  $^{219}\text{Rn}$ ,  $^{215}\text{Po}$ ,  $^{221}\text{Fr}$ ,  $^{255}\text{Fm}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{224}\text{Ac}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{113}\text{mIn}$ ,  $^{95}\text{Ru}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{103}\text{Ru}$ ,  $^{105}\text{Ru}$ ,  $^{107}\text{Hg}$ ,  $^{203}\text{Hg}$ ,  $^{121}\text{mTe}$ ,  $^{122}\text{mTe}$ ,  $^{125}\text{mTe}$ ,  $^{165}\text{Tm}$ ,  $^{167}\text{Tm}$ ,  $^{168}\text{Tm}$ ,  $^{197}\text{Pt}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{143}\text{Pr}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{201}\text{Tl}$ ,  $^{76}\text{Br}$  и  $^{169}\text{Yb}$ .

Применение описанной выше композиции для изготовления лекарства для предотвращения и/или лечения аутоиммунного заболевания, иммунного ответа против трансплантата, аллергии, инфекции, нейродегенеративного заболевания или опухоли.

Предпочтительно аутоиммунным заболеванием является одно или более, выбранное из группы, состоящей из артрита, ревматоидного артрита, псориаза, рассеянного склероза, язвенного колита, болезни Крона, системной красной волчанки, гломерулонефрита, заболевания наподобие дилатационной кардиомиопатии, синдрома Шегрена, аллергического контактного дерматита, полимиозита, склеродермии, периаартериального полиартрита, ревматической лихорадки, витилиго, инсулинозависимого сахарного диабета, синдрома Бехчета и хронического тиреоидита.

Предпочтительно нейродегенеративным заболеванием является одно или более, выбранное из группы, состоящей из болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, болезни Мачадо-Джозефа, амиотрофического бокового склероза и болезни Крейтцфельда-Якоба.

Предпочтительно опухолью является одно или более, выбранное из группы, состоящей из лейкемии, лимфомы, миеломы, опухоли головного мозга, плоскоклеточного рака головы и шеи, немелкоклеточного рака легких, рака носоглотки, рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака печени, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака эндометрия, саркомы матки, рака простаты, рака мочевого пузыря, почечно-клеточного рака и меланомы.

Применение описанного выше антитела и его функционального фрагмента для изготовления лекарства для предотвращения и/или лечения аутоиммунного заболевания, иммунного ответа против трансплантата, аллергии, инфекции, нейродегенеративного заболевания и опухоли.

Лекарственный препарат для предотвращения и/или лечения аутоиммунного заболевания, иммунного ответа против трансплантата, аллергии, инфекции, нейродегенеративного заболевания и опухоли, лекарственный препарат содержит антитело, способное специфически связываться с PD-1, и его функциональный фрагмент, способный специфически связываться с PD-1, как описано выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

Альтернативно, лекарственный препарат содержит описанную выше композицию и фармацевтически приемлемый носитель.

В рамках изобретения термин "фармацевтически приемлемый" означает, что состав является физиологически приемлемым, когда состав вводят человеку, и он не вызывает аллергическую реакцию, такую как расстройство пищеварения, головокружение или другую аллергическую реакцию, или системную аллергическую реакцию, похожую на эти аллергические реакции.

Согласно настоящему раскрытию "фармацевтически приемлемый носитель" включает, но без ограничения, связующие вещества (такие как микрокристаллическая целлюлоза, альгинаты, желатин и поливинилпирролидон), наполнители (такие как крахмал, сахароза, глюкоза и безводная молочная кислота), разрыхлители (такие как поперечно-сшитый поливинилпирролидон, поперечно-сшитый натрий карбоксиметилкрахмал, кросскармеллоза натрия и низкозамещенная гидроксипропилцеллюлоза), смазывающие материалы (стеарат магния, стеарат алюминия, тальк, этиленгликоль, бензоат натрия), увлажняющее средство (такое как глицерин), поверхностно-активные вещества (такие как цетиловый спирт) и усилители поглощения, ароматизирующие средства, подсластители, разбавители, покрывающие средства и т.д.

Применение описанного выше антитела и его функционального фрагмента для предотвращения и/или лечения аутоиммунного заболевания, иммунного ответа против трансплантата, аллергии, инфекции, нейродегенеративного заболевания или опухоли.

Предпочтительно аутоиммунным заболеванием является одно или более, выбранное из группы, со-

стоящей из артрита, ревматоидного артрита, псориаза, рассеянного склероза, язвенного колита, болезни Крона, системной красной волчанки, гломерулонефрита, заболевания наподобие дилатационной кардиомиопатии, синдрома Шегрена, аллергического контактного дерматита, полимиозита, склеродермии, периферического полиартрита, ревматической лихорадки, витилиго, инсулинозависимого сахарного диабета, синдрома Бехчета и хронического тиреоидита.

Предпочтительно нейродегенеративным заболеванием является одно или более, выбранное из группы, состоящей из болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, болезни Мачадо-Джозефа, амиотрофического бокового склероза и болезни Крейтцфельда-Якоба.

Предпочтительно опухолью является одно или более, выбранное из группы, состоящей из лейкемии, лимфомы, миеломы, опухоли головного мозга, плоскоклеточного рака головы и шеи, немелкоклеточного рака легких, рака носоглотки, рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака печени, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака эндометрия, саркомы матки, рака простаты, рака мочевого пузыря, почечно-клеточного рака и меланомы.

Способ предотвращения и/или лечения аутоиммунного заболевания, иммунного ответа против трансплантата, аллергии, инфекции, нейродегенеративного заболевания или опухоли включает введение лекарственного препарата нуждающемуся в нем субъекту.

Предпочтительно упомянутым выше пациентом является человек.

#### **Краткое описание чертежей**

Для того, чтобы более ясно проиллюстрировать конкретные варианты осуществления настоящего раскрытия или технические решения предшествующего уровня техники, ниже будут кратко описаны чертежи, используемые в конкретных вариантах осуществления или в описании предшествующего уровня техники, и очевидно, что чертежи в следующем описании представляют собой некоторые варианты осуществления настоящего раскрытия, и рядовой специалист в данной области на основе этих чертежей может получить другие чертежи без всякой творческой работы.

На фиг. 1 представлена активность связывания PD-1 человека моноклональных антител, секретруемых клоном № 2, описанным в примере 1.

На фиг. 2 представлена активность блокирования PD-1/PD-L1 моноклональных антител, секретруемых клоном № 2 в примере 1.

На фиг. 3 представлена активность связывания PD-1 человека химерных моноклональных антител против PD-1 человека в примере 3.

На фиг. 4 представлена видовая специфичность химерных моноклональных антител против PD-1 человека в примере 4.

На фиг. 5 представлена специфичность связывания химерных моноклональных антител против PD-1 человека в примере 4.

На фиг. 6 представлена активность блокирования PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2 химерных моноклональных антител против PD-1 человека в примере 5.

На фиг. 7 представлена активность регулирования функции Т-клеток химерных моноклональных антител против PD-1 человека в примере 6.

На фиг. 8 представлена кривая концентрация-время химерных моноклональных антител против PD-1 человека после одной внутривенной инъекции крысе в примере 7.

На фиг. 9 представлена противоопухолевая эффективность *in vivo* химерных моноклональных антител против PD-1 человека в примере 8.

#### **Подробное описание**

Ниже варианты осуществления настоящего раскрытия будут подробно описаны со ссылкой на варианты осуществления. Однако, рядовому специалисту в данной области будет понятно, что следующие варианты осуществления предназначены всего лишь для иллюстрации настоящего раскрытия и не предназначены для ограничения объема раскрытия. Для тех вариантов осуществления, в которых конкретные условия не указаны, их выполняют согласно обычным условиям или условиям, рекомендуемым производителем. Для тех используемых реагентов или инструментов, производители которых не указаны, они все являются широкодоступными на рынке изделиями.

Пример 1. Получение мышинных моноклональных антител против PD-1 человека.

1.1. Иммунизация животного.

В качестве экспериментальных животных использовали самок мышей BALB/c 6-8 недельного возраста, купленных у Beijing Huafukang Biotechnology Co. Ltd. Через неделю после акклиматизации мышей в окружающих условиях начали иммунизацию. Для первоначальной иммунизации 100 мкг рекомбинантного белка PD-1-Fc человека тщательно перемешивали с полным адьювантом Фрейнда (Sigma-Aldrich, номер по каталогу F5881) с образованием эмульсии, которую внутрибрюшинно инъецировали мышам. Спустя две недели проводили бустер-иммунизацию. Для бустер-иммунизации 50 мкг рекомбинантного белка PD-1-Fc человека тщательно перемешивали с неполным адьювантом Фрейнда (Sigma-Aldrich, номер по каталогу F5806) с образованием эмульсии, которую внутрибрюшинно инъецировали мышам. Иммунизацию проводили одинаково каждые 2 недели, в общей сложности 3 раза. На седьмой день после

последней иммунизации брали кровь из ретроорбитального венозного сплетения мышей и центрифугировали для отделения сыворотки, и титр антител определяли посредством ELISA. Мышей с высокими титрами выбирали для гибридизации для получения гибридом. За три дня до гибридизации 50 мкг рекомбинантного белка PD-1-Fc человека внутривенно инъецировали мышам без адьюванта. В день гибридизации асептически удаляли селезенку для получения суспензии отдельных клеток селезенки для использования. 1.2. Получение Гибридом Миеломные клетки SP2/0 в логарифмической фазе роста центрифугировали при 1000 об./мин в течение 5 мин, супернатант выбрасывали, и клетки суспендировали в неполной среде DMEM (Gibco, cat № 11965) и подсчитывали. Брали необходимые клетки, дважды промывали неполной культуральной средой. Одновременно суспензию клеток селезенки, полученной у мыши после иммунизации, дважды промывали неполной культуральной средой. Миеломные клетки и клетки селезенки перемешивали в соотношении 1: 10 или 1: 5 и один раз промывали неполной культуральной средой в 50 мл пластмассовой центрифужной пробирке, а затем центрифугировали при 1200 об./мин в течение 8 мин. Супернатант выбрасывали, а для удаления остаточной жидкости использовали пипетку Пастера. Центрифужную пробирку осторожно постукивали по ладони для получения свободных и равномерных осажденных клеток, а затем пробирку помещали в водяную баню при 40°C для предварительного нагрева. 1 мл 45% PEG-4000 (pH 8,0, Sigma, cat № P7181), предварительно нагретого до 40°C, добавляли 1 мл пипеткой приблизительно 1 мин (оптимальное время 45 с), осторожно взбалтывали пипеткой при добавлении (взбалтывали пипеткой), видимых частиц не должно быть видно невооруженным глазом. 20-30 мл неполной среды, предварительно нагретой до 37°C, добавляли в пробирку 10 мл пипеткой в течение 90 с для прекращения действия PEG, и обеспечивали отстаивание при 20-37°C в течение 10 мин. Пробирку центрифугировали при 1000 об./мин в течение 5 мин, и супернатант выбрасывали. Добавляли 5 мл среды HAT (DMEM+HAT, Sigma, cat №1 H0262-10VL), и осажденные клетки осторожно перемешивали (нужно помнить, что не надо сильно дуть, чтобы не разделить слитые клетки) для получения хорошо перемешанной суспензии. Добавляли дополнительную среду HAT до 80-100 мл (получали концентрацию клеток селезенки, составляющую  $1-2 \times 10^6$ /мл). Суспензию распределяли в 96-луночный планшет для клеточных культур, 0,1 мл на лунку; и в 24-луночный планшет, 1,0-1,5 мл на лунку. Планшеты инкубировали в инкубаторе при 37°C с 6% CO<sub>2</sub>. Обычно, использовали шесть 96-луночных планшетов. Спустя 5 дней 1/2 среды заменяли свежей средой HAT. Спустя 7-10 дней среду HAT заменяли средой HT (DMEM+HT, Sigma cat № H0137-10VL). Регулярно наблюдали за ростом клеток гибридомы, и супернатант собирали для обнаружения антител после того, как слияние клеток достигало 1/10 или более. Положительные колонии увеличивали в объеме и замораживали.

### 1.3. Скрининг и идентификация клона.

Для скрининга антител против PD-1 человека из супернатантов культур гибридом использовали ELISA. Рекомбинантным PD-1 человека (купленный у Sino Biological Inc. номер по каталогу 10377-H08H) покрывали 96-луночный высокопоглощающий планшет ELISA с карбонатным буферным раствором с pH 9,6, концентрация покрытия составляла 1 мкг/мл, величина покрытия составляла 100 мкл на лунку, и покрытие осуществляли при 4°C в течение ночи. Планшет промывали PBST пять раз, блокировали по 300 мкл/лунку PBST, содержащего 1% BSA, а затем инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. В каждую лунку добавляли 100 мкл образцов супернатанта культуры и контроля положительной сыворотки, соответственно, а затем планшет инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл меченых пероксидазой хрена антител против IgG мыши (Abeam, номер по каталогу Ab7068), разведенных 1:10000 в PBST, содержащем 1% BSA, а затем планшет инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. 100 мкл/лунку колориметрического субстрата TMB добавляли и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Формирование цвета прекращали путем добавления 100 мкл/лунку 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Поглощение при 450 нм считывали на устройстве для считывания микропланшетов. Положительные клоны, способные вырабатывать антитела против PD-1 человека, выбирали на основе значения считывания при OD 450 нм.

Посредством ELISA определяли, могут ли антитела против PD-1 человека, вырабатываемые положительными клонами, блокировать связывание PD-1/PD-L1. Рекомбинантным PD-1-Fc человека покрывали 96-луночный высокопоглощающий планшет ELISA с карбонатным буферным раствором с pH 9,6, концентрация покрытия составляла 1 мкг/мл, величина покрытия составляла 100 мкл на лунку, и покрытие осуществляли при 4°C в течение ночи. Планшет промывали PBST пять раз, блокировали по 300 мкл/лунку PBST, содержащего 1% BSA, а затем инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. В каждую лунку добавляли 50 мкл образца антител против PD-1 человека и положительного контроля, соответственно, а затем добавляли меченый биотином PD-L1 в концентрации 20 нМ (итоговая концентрация 10 нМ), 50 мкл/лунку, а затем инкубировали при 25°C в течение 90 мин. Планшет промывали PBST пять раз. Затем добавляли Streptavidin-HRP (BD Pharmingen, номер по каталогу 554066), разведенный 1:1000 в PBST, содержащем 1% BSA, 100 мкл /лунку, а затем инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Добавляли 100 мкл/лунку колориметрического субстрата TMB, и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Формирование цвета

прекращали путем добавления 100 мкл/лунку 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Поглощение при 450 нм считывали на устройстве для считывания микропланшетов. Антитела против PD-1 человека, способные ингибировать связывание PD-1-Fc человека/меченого биотином PD-L1, определяли по наличию нейтрализующей активности. Положительные клоны, способные вырабатывать нейтрализующие антитела против PD-1 человека, выбирали на основе блокирующей способности.

Как показано на фиг. 1, клон № 2 имел сильную активность связывания PD-1 человека; как показано на фиг. 2, клон № 2 также имел довольно сильную блокирующую активность против связывания PD-1/PD-L1 человека.

#### 1.4. Секвенирование моноклональных антител.

Клоны, имеющие как активность связывания антигена, так и активность нейтрализации антигена, полученные посредством скрининга, подвергали секвенированию последовательности ДНК антитела. Клеточную мРНК сперва экстрактировали с использованием набора для очистки RNArpг (Tiangen, DP430). Этапы были следующие:  $1 \times 10^7$  клеток центрифугировали при  $300 \times g$  в течение 5 мин и собирали в центрифужную пробирку, и весь супернатант осторожно отсасывали. Немедленно осуществляли этап лизиса. Щелкали по дну центрифужной пробирки для разрыхления клеточного осадка, добавляли 600 мкл лизирующего буфера RL и перемешивали вихревым способом. Весь раствор переносили в фильтрующую колонку CS (фильтрующую колонку CS помещали в пробирку-сборник), центрифугировали при 12,000 об./мин ( $\sim 13,400 \times g$ ) в течение 2 мин, и собирали фильтрат. В фильтрат добавляли однократный объем 70% этанола (обычно 350 мкл или 600 мкл), хорошо перемешивали, полученный раствор и осадок переносили в адсорбционную колонку CR3 (адсорбционную колонку CR3 помещали в пробирку-сборник), центрифугировали при 12,000 об./мин ( $\sim 13,400 \times g$ ) в течение 30-60 с, жидкие отходы в пробирке-сборнике удаляли, адсорбционную колонку CR3 помещали назад в пробирку-сборник. 350 мкл безбелкового раствора RW1 добавляли в адсорбционную колонку CR3, центрифугировали при 12,000 об./мин ( $\sim 13,400 \times g$ ) в течение 30-60 с, жидкие отходы в пробирке-сборнике удаляли, адсорбционную колонку CR3 помещали назад в пробирку-сборник. 80 мкл рабочего раствора ДНКазы I добавляли в центр адсорбционной колонки CR3, и обеспечивали отстаивание колонки CR3 при комнатной температуре в течение 15 мин. 350 мкл безбелкового раствора RW1 добавляли в адсорбционную колонку CR3, центрифугировали при 12,000 об./мин ( $\sim 13,400 \times g$ ) в течение 30-60 с, жидкие отходы в пробирке-сборнике удаляли, адсорбционную колонку CR3 помещали назад в пробирку-сборник. В адсорбционную колонку CR3 добавляли 500 мкл промывающего раствора RW (проверяли, добавили ли этанол перед использованием), обеспечивали отстаивание колонки CR3 при комнатной температуре в течение 2 мин, центрифугировали при 12,000 об./мин ( $\sim 13,400 \times g$ ) в течение 30-60 с, жидкие отходы в пробирке-сборнике удаляли, адсорбционную колонку CR3 помещали назад в пробирку-сборник. Колонку CR3 центрифугировали при 12,000 об./мин ( $\sim 13,400 \times g$ ) в течение 2 мин, и отходы удаляли. Адсорбционную колонку CR3 оставляли при комнатной температуре в течение нескольких минут, обеспечивая полное высыхание оставшегося промывающего раствора в адсорбирующем материале. Адсорбционную колонку CR3 переносили в новую не содержащую РНКазу центрифужную пробирку, добавляли 30-100 мкл не содержащей РНКазы ddH<sub>2</sub>O, обеспечивали отстаивание пробирки при комнатной температуре в течение 2 мин, а затем центрифугировали при 12,000 об./мин ( $\sim 13,400 \times g$ ) в течение 2 мин для получения раствора РНК.

Синтезировали первую цепь кДНК с использованием набора QuantScript RT (Tiangen, KR103). Этапы состоят в следующем: матричную РНК размораживали на льду; праймер, смесь 10×RT (содержащую RNasin и DTT), смесь сверхчистого dNTP, не содержащую РНКазу ddH<sub>2</sub>O размораживали при комнатной температуре (15-25°C), и помещали на лед немедленно после размораживания. Каждый раствор хорошо перемешивали вихревой мешалкой перед использованием, пробирку недолго центрифугировали для сбора остаточной жидкости на стенке пробирки. Смесь системы обратной транскрипции (набор для синтеза первой цепи кДНК Tiangen Bio Quant, номер по каталогу KR103-04; 10×буфер для обратной транскрипции 2 мкл, dNTP высокой очистки 2 мкл, случайный праймер 2 мкл, фермент для обратной транскрипции 1 мкл) получали согласно табл.1. Смесь тщательно перемешивали, продолжительность вихревого перемешивания не более 5 мин; а затем недолго центрифугировали и помещали на лед. В заключение, в смесь добавляли матричную РНК (от 50 нг до 2 мкг), тщательно перемешивали, продолжительность вихревого перемешивания не более чем 5 с, недолго центрифугировали для сбора остаточной жидкости на стенках пробирки, инкубировали при 37°C в течение 60 мин. Первую цепь кДНК, полученную посредством обратной транскрипции, использовали для последующей реакции ПЦР.

В таблице 1 показаны праймеры, используемые в реакции ПЦР.

Таблица 1

VHпраймер
F1 : GAGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGACCTAGCCTGGTG
R1 : AGGT (C/G) (A/C) AACTGCAG (C/G) AGTC (A/T) GG
R2 : AGGT (C/G) (A/C) AGCTGCAG (C/G) AGTC (A/T) GG
R3 : AGGT (C/G) CAGCTGCAG (C/G) AGTC (A/T) GG
R4 : CCAGGGGCCAGTGGATAGACAAGCTTGGGTGTCGTTTT
F2 : ATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC
F3 : CTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA
F4 : AGGGGCCAGTGGATAGACTGATGG
F5 : AGGGACCAAGGGATAGACAGATGG
R5 : (G/C) A (A/G) GT (A/T/C/G) (A/C) AGCTG (G/C) AG (G/C) AGTC
R6 : (G/C) A (A/G) GT (A/T/C/G) (A/C) AGCTG (G/C) AG (G/C) AGTC (A/T) GG
VLпраймер
R1 : GGTGATATCGTGAT (A/G) AC (C/A) CA (G/A) GATGAACTCTC
R2 : GGTGATATC (A/T) TG (A/C) TGACCCAA (A/T) CTCCTCTC
R3 : GGTGATATCGT (G/T) CTCAC (C/T) CA (A/G) TCTCCAGCAAT
F1 : GGGAAAGATGGATCCAGTTGGTGCAGCATCAGC
F2 : GGATACAGTTGGTGCAGCATC
R4 : GA (C/T) ATTGTG (A/C) T (G/C) AC (A/C) CA (A/G) (A/T) CT (A/C) CA

При использовании праймеров любой прямой праймер VH праймеров можно использовать с любым обратным праймером; таким же образом любой прямой праймер VL праймеров также можно использовать с любым обратным праймером. Целевую полосу, полученную посредством ПЦР-амплификации, клонировали в вектор рGEM-T. Для секвенирования ДНК выбирали один клон.

Пример 2. Получение химерных моноклональных антител против PD-1 человека.

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела, полученная посредством ПЦР-амплификации, показана в SEQ ID NO: 10, и аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела показана в SEQ ID NO: 14. Последовательность определяющей комплементарность области можно получить посредством исключения последовательности каркасной области из последовательности вариабельной области мыши; причем аминокислотные последовательности трех определяющих комплементарность областей CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 легкой цепи показаны в SEQ ID NO: 1, 5 и 6, соответственно; аминокислотные последовательности трех определяющих комплементарность областей CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 тяжелой цепи показаны в SEQ ID NO: 7, 8 и 9, соответственно. Упомянутые выше последовательности вариабельной области клонировали в эукариотический вектор экспрессии X0GC, аминокислотная последовательность константной области легкой цепи антитела показана в SEQ ID NO: 15, а аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи антитела показана в SEQ ID NO: 16. Векторы, экспрессирующие легкую цепь антитела (полную длину легкой цепи составляла вариабельная область легкой цепи антитела, связанная с SEQ ID NO: 15) и тяжелую цепь (полную длину тяжелой цепи составляла вариабельная область тяжелой цепи антитела, связанная с SEQ ID NO: 16), трансфицировали в клеточную линию 293F (Freestyle™ Клетки 293-F, номер по каталогу R79007, Invitrogen). Клетки пересевали за день перед трансфекцией. В день трансфекции клетки собирали посредством центрифугирования, а затем ресуспендировали в свежей экспрессионной среде 293 Freestyle™ (экспрессионная среда 293FreeStyle™, номер по каталогу 12338001, Gibco) с плотностью  $200 \times 10^5$  клеток/мл. Плазмиды добавляли на основе объема трансфекции до итоговой концентрации 36,67 мкг/мл, осторожно перемешивали; затем добавляли линейный PEI (полиэтиленимин, линейный, молекулярная масса 25000, номер по каталогу 43896, Alfa Aesar) до итоговой концентрации 55 мкг/мл, осторожно перемешивали. После этого клетки помещали во встряхиватель при 120 об./мин и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Затем добавляли 19-кратный объем трансфекции свежей среды, и клетки непрерывно культивировали при 37°C во встряхивателе при 120 об./мин. Супернатант культуры через 5-6 дней после трансфекции собирали посредством центрифугирования.

Пример 3. Активность связывания и кинетика химерных моноклональных антител против PD-1 человека.

Активность связывания химерных моноклональных антител против PD-1 человека с его антигеном PD-1 человека определяли посредством ELISA. Рекомбинантным PD-1 человека (купленным у Sino Biological Inc.) покрывали 96-луночный высокопоглощающий планшет ELISA с карбонатным буферным раствором с pH 9,6, концентрация покрытия составляла 1 мкг/мл, величина покрытия составляла 100 мкл

на лунку, и покрытие осуществляли при 4°C в течение ночи. Планшет промывали PBST пять раз, и блокировали по 300 мкл/лунку PBST, содержащего 1% BSA, а затем инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Добавляли образцы контроля моноклональными антителами, пембролизумаба и химерных моноклональных антител против PD-1 человека, серийно разведенные в PBST, содержащем 1% BSA, 100 мкл на лунку, инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Затем добавляли меченые пероксидазой хрена антитела против IgG человека (Chemicon, номер по каталогу AP309P), разведенные 1:2000 в PBST, содержащем 1% BSA, 100 мкл на лунку, инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Добавляли 100 мкл/лунку колориметрического субстрата TMB, и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Формирование цвета прекращали путем добавления 100 мкл/лунку 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Поглощение при 450 нм считывали на устройстве для считывания микропланшетов.

Результат показан на фиг. 3, химерные моноклональные антитела против PD-1 человека имеют хорошую аффинность связывания с PD-1 человека, аналогичную активности связывания пембролизумаба.

Кинетику связывания химерных моноклональных антител против PD-1 человека с их антигеном PD-1 человека определяли с использованием Biacore X100. В приборе используется технология плазмонного резонанса оптической поверхности для выявления ассоциации и диссоциации между молекулой, соединенной на сенсорном чипе, и анализом. Использовали чипы CM5 (GE Healthcare, BR-1000-12). Краткая методика эксперимента состоит в следующем: химерные антитела против PD-1 человека разводили до 2 мкг/мл рабочим буфером (1×HBS-EP+10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% поверхностно-активное вещество P20, pH 7,4), затем инжестировали со скоростью 10 мкл/мин на чип CM5, связанный с антителом против IgG человека, с продолжением в течение 60 с. В фазе ассоциации антиген PD-1 разводили рабочим буфером до множества концентраций, и инжестировали со скоростью 30 мкл/мин в течение 180 с. В фазе диссоциации продолжительность диссоциации составляла 1200 с. Раствор глицина (GE Healthcare, BR-1003-54) использовали для регенерации в течение 30 с со скоростью 10 мкл/мин. Экспериментальный метод контрольных антител был аналогичный, за исключением регулировки продолжительности диссоциации до 600 с. Константу скорости ассоциации и константу скорости диссоциации анализировали и рассчитывали с помощью программного обеспечения для оценки Biacore X100. См. Таблицу 2 для константы скорости ассоциации, константы скорости диссоциации и константы равновесия при диссоциации химерных антител против PD-1 человека. Данные демонстрируют, что по сравнению с пембролизумабом, после связывания с антигеном PD-1 химерные моноклональные антитела против PD-1 человека могут сохранять состояние связывания в течение более долгого времени, и их нелегко диссоциировать, что вносит значительный вклад в их биологические функции.

Таблица 2. Кинетика связывания химерных антител против PD-1 человека с PD-1 человека

Образец	K <sub>он</sub> (1/мс)	K <sub>офф</sub> (1/с)	K <sub>D</sub> (нМ)
Пембролизумаб	3,731E+5	2,708E - 3	7,257
Химерные Антитела против PD-1 человека	2,150E+5	2,950E - 4	1,372

Пример 4. Видовая специфичность и специфичность связывания химерных моноклональных антител против PD-1 человека.

Видовая специфичность химерных моноклональных антител против PD-1 человека определяли посредством ELISA.

Рекомбинантным PD-1 человека, PD-1 обезьяны, PD-1 крысы и PD-1 мыши (все куплены у Sino Biological Inc.) покрывали 96-луночный высокопоглощающий планшет ELISA с карбонатным буферным раствором с pH 9,6, концентрация покрытия составляла 1 мкг/мл, величина покрытия составляла 100 мкл на лунку, и покрытие осуществляли при 4°C в течение ночи. Планшет промывали PBST пять раз, и блокировали по 300 мкл/лунку PBST, содержащего 1% BSA, а затем инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Добавляли контроль и образец химерных моноклональных антител против PD-1 человека, серийно разведенных в PBST, содержащем 1% BSA, 100 мкл на лунку, инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Затем добавляли меченые пероксидазой хрена антитела против IgG человека (Chemicon, номер по каталогу AP309P), разведенные 1:2000 в PBST, содержащем 1% BSA, 100 мкл на лунку, инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Добавляли 100 мкл/лунку колориметрического субстрата TMB, и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Формирование цвета прекращали путем добавления 100 мкл/лунку 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Поглощение при 450 нм считывали на устройстве для считывания микропланшетов.

Специфичность связывания химерных моноклональных антител против PD-1 человека определяли посредством ELISA.

Рекомбинантным PD-1, CD28, CTLA4, ICOS, BTLA, PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, B7-H2 человека (все куплены у Sino Biological Inc.), покрывали 96-луночный высокопоглощающий планшет ELISA с карбонатным буферным раствором с pH 9,6, концентрация покрытия составляла 1 мкг/мл, величина по-

крытия составляла 100 мкл на лунку, и нанесение проводили при 4°C в течение ночи. Планшет промывали PBST пять раз, и блокировали по 300 мкл/лунку PBST, содержащего 1% BSA, и инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Добавляли контроль и образец химерных моноклональных антител против PD-1 человека, разведенных в PBST, содержащем 1% BSA, 100 мкл на лунку, инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Затем добавляли меченые пероксидазой хрена антитела против IgG человека (Chemicon, номер по каталогу AP309P), разведенные 1:2000 в PBST, содержащем 1% BSA, в каждую лунку добавляли 100 мкл, инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Добавляли 100 мкл/лунку колориметрического субстрата ТМВ, и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Формирование цвета прекращали путем добавления 100 мкл/лунку 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Поглощение при 450 нм считывали на устройстве для считывания микропланшетов.

Результат показан на фиг. 4, химерные моноклональные антитела против PD-1 человека могли связываться с PD-1 человека и PD-1 обезьяны с аналогичной аффинностью, но не связывались с PD-1 крысы и мыши, означая, что они являются видоспецифичными. Кроме того, как показано на фиг. 5, химерные моноклональные антитела против PD-1 человека также обладают превосходной специфичностью связывания, причем связываются только с PD-1, но не с другими элементами семейства CD28 или семейства B7.

Пример 5. Активность блокирования PD-1 и лигандов химерных моноклональных антител против PD-1 человека.

Рекомбинантным PD-1-Fc человека покрывали 96-луночный высокопоглощающий планшет ELISA с карбонатным буферным раствором с pH 9,6, концентрация покрытия составляла 1 мкг/мл, величина покрытия составляла 100 мкл на лунку, и нанесение проводили при 4°C в течение ночи. Планшет промывали PBST пять раз, и блокировали по 300 мкл/лунку PBST, содержащего 1% BSA, и инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Добавляли положительный контроль и образец антител против PD-1 человека, 50 мкл на лунку. А затем добавляли меченый биотином PD-L1 в концентрации 20 нМ (итоговая концентрация 10 нМ), или меченый биотином PD-L2 в концентрации 320 нМ (итоговая концентрация 160 нМ), 50 мкл на лунку, инкубировали при 25°C в течение 90 мин. Планшет промывали PBST пять раз. Затем добавляли Streptavidin-HRP (BD Pharmingen, номер по каталогу 554066), разведенный 1:1000 в PBST, содержащем 1% BSA, 100 мкл на лунку, инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Добавляли 100 мкл/лунку колориметрического субстрата ТМВ, и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Формирование цвета прекращали путем добавления 100 мкл/лунку 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Поглощение при 450 нм считывали на устройстве для считывания микропланшетов.

Результат показан на фиг. 6, химерные моноклональные антитела против PD-1 человека имеют аналогичную активность блокирования PD-1/PD-L1 и PD-1/PD-L2 по сравнению с активностью пембролизумаба.

Пример 6. Активность регулирования функции Т-клеток химерными моноклональными антителами против PD-1 человека PBMC, используемый в эксперименте, покупали у Lonza, номер по каталогу CC-2702.

Индукция DC-клеток PBMC: PBMC восстанавливали полной средой (RPMI 1640+10% FBS), затем один раз промывали не содержащей сыворотку средой; клетки ресуспендировали в не содержащей сыворотку среде, и высевали в колбу для клеточной культуры, а затем инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Спустя 90 мин удаляли не слипшиеся клетки и среду; слипшиеся моноциты культивировали в полной среде, содержащей 100 нг/мл GM-CSF и 100 нг/мл IL-4, и спустя 3 дня среду заменяли. После культивирования клеток еще 3 дня, среду заменяли полной средой, содержащей 100 нг/мл GM-CSF, 100 нг/мл IL-4 и 20 нг/мл TNF-альфа и культивировали еще один день для завершения индукции DC-клеток. Т-клетки выделяли из PBMC, полученных у другого индивида: Т-клетки выделяли с использованием набора для выделения пан Т-клеток от Miltenyi Biotec (Номер по каталогу 5150414820), следуя инструкциям по методике конкретного эксперимента. DC-клетки с индуцированным созреванием высевали в 96-луночный планшет, 10,000 клеток на лунку, и добавляли выделенные Т-клетки, 100,000 клеток на лунку; а затем добавляли тестируемый образец, и вместе инкубировали в течение 120 ч. В конце инкубации собирали супернатант, и выявляли уровни IL-2 и IFN-гамма (IFN-γ) с использованием набора ELISA, купленного у RayBiotech.

Результат показан на фиг. 7, в системе MLR химерные моноклональные антитела против PD-1 человека усиливали секрецию IL-2 и IFN-гамма (IFN-γ) и демонстрировали аналогичное действие на регулирование функциональной активности Т-клеток по сравнению с активностью пембролизумаба.

Пример 7. Фармакокинетическое исследование химерных моноклональных антител против PD-1 человека у крыс.

В качестве экспериментальных животных использовали самок крыс SD, 6-8 недельного возраста, купленных у Beijing Huafukang Biotechnology Co. Ltd. Через одну неделю после акклиматизации крыс к окружающим условиям крыс случайным образом делили на группы, по 3 крысы в группу. Химерные

моноклональные антитела против PD-1 человека и контрольные моноклональные антитела, пембролизумаб, вводили, соответственно, в дозе 20 нмоль/кг посредством единственной дозы внутривенной инъекции. Через 0, 5, 30 мин, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 216, 264, 312 ч после введения брали образец крови из ретроорбитального синуса без антикоагуляции, и обеспечивали отстаивание образца крови при комнатной температуре в течение от 30 мин до 1 ч; после коагуляции образец крови центрифугировали при 3,000 об./мин в течение 10 мин, полученный образец сыворотки замораживали при -80°C и сохраняли для тестирования.

Концентрации химерных моноклональных антител против PD-1 человека и контрольных моноклональных антител, пембролизумаба, в сыворотке определяли посредством ELISA. Кратко, рекомбинантным белком PD-1 человека покрывали высокопоглощающий планшет ELISA с карбонатным буферным раствором с pH 9,6 при 4°C в течение ночи. Планшет промывали PBST. Для предотвращения неспецифического связывания планшет блокировали PBST, содержащим 5% порошок обезжиренного молока, а затем промывали PBST. Затем образец тестируемой сыворотки разводили PBST, содержащим 10% перемешанную крысиную сыворотку, и добавляли 1% BSA, и инкубировали при 25°C в течение 1 ч, и планшет промывали PBST. Добавляли меченые пероксидазой хрена антитела против IgG человека (Chemicon, номер по каталогу AP309P), разведенные в PBST, содержащем 5% сухое обезжиренное молоко, инкубировали при 25°C в течение 1 ч, затем планшет промывали PBST. В заключение, формирование цвета осуществляли с использованием колориметрического субстрата TMB при комнатной температуре в течение 10 мин. Формирование цвета прекращали путем добавления 100 мкл/лунку 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Поглощение при 450 нм считывали на устройстве для считывания микропланшетов.

Результат показан на фиг. 8, единственная доза внутривенной инъекции 20 нмоль/кг химерных моноклональных антител против PD-1 человека или контрольных моноклональных антител, пембролизумаб, демонстрировала похожие кривые концентрация-время и фармакокинетические признаки у крыс. Фармакологические параметры химерных моноклональных антител против PD-1 человека следующие: период полувыведения  $t_{1/2}$  составлял 212 ч; площадь под кривой концентрация-время AUC<sub>0-312hr</sub> составляла 33967 нМ·ч; оцениваемая первоначальная концентрация C<sub>0</sub> составляла 464 нМ; кажущийся объем распределения Vd составлял 118 мл/кг; клиренс CL составлял 0,39 мл/ч/кг; среднее время удержания MRT<sub>last</sub> составляло 119 ч.

Пример 8. Противоопухолевая эффективность химерных моноклональных антител против PD-1 человека In Vivo.

В настоящем примере определяли ингибирующее рост действие химерных моноклональных антител против PD-1 человека на ксенотрансплантаты опухоли HCC827, инокулированные PBMC гуманизированным мышам.

В качестве экспериментальных материалов использовали самок иммунодефицитных мышей NCG, в возрасте 6-8 недель, купленных у Nanjing Galaxy BioPharma Co. Ltd. Через одну неделю после акклиматизации мышей к окружающим условиям каждой мыши инокулировали  $1 \times 10^7$  клеток немелкоклеточного рака легких человека HCC827 (купленных у Basic Medical Cell Center of the Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences). Когда размер опухоли достигал приблизительно 100 мм<sup>3</sup>, мышей делили на группы согласно размеру опухоли, по 6 мышей в группе, включая группу контроля растворителем, группу введения химерных моноклональных антител против PD-1 человека и группу введения пембролизумаба. Каждой мыши внутривенно инъецировали  $5 \times 10^6$  клеток PBMC человека для гуманизации иммунной системы, а затем внутрибрюшинно вводили растворитель или антитела согласно дизайну группы, доза составляла 70 нмоль/кг. Мышам вводили дважды в неделю в течение 3 недель. Со дня введения размер опухоли измеряли 3 раза в неделю, измеряли наибольший диаметр "a" и ширину "b", размер опухоли рассчитывали как: (мм<sup>3</sup>)=(a×b<sup>2</sup>)/2.

Результат показан на фиг. 9, химерные моноклональные антитела против PD-1 человека обладали противоопухолевой активностью и ингибировали рост трансплантата немелкоклеточного рака легких HCC827 у PBMC гуманизированных мышей, показывая, что они обладают сопоставимой или немного большей противоопухолевой эффективностью по сравнению с эффективностью пембролизумаба.

Пример 9. Получение Гуманизированных Моноклональных Антител против PD-1 человека.

Гуманизированные моноклональные антитела против PD-1 человека получали по методу Leung et al. (Molecule Immunol, 1995, 32: 1413-27).

Гуманизированную матрицу, которая лучше всего соответствует последовательности вариабельной области мышинных антител, выбирали из базы данных Germline. Матрицей для вариабельной области легкой цепи является IGKV3-11\*01, последовательность показана в SEQ ID NO: 43; матрицей для вариабельной области тяжелой цепи является IGHV3-23\*04, и последовательность показана в SEQ ID NO: 44. Области CDR выбранной матрицы человека заменяли областями CDR мышинных антител. Полученная трансплантированная вариабельная область легкой цепи гуманизированного антитела имеет последовательность, показанную в SEQ ID NO: 45, и трансплантированная вариабельная область тяжелой цепи гуманизированного антитела имеет последовательность, показанную в SEQ ID NO: 46. Для обратной мутации выбирали участки на SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46, а для мутации для удаления возможного

участка гликозилирования выбрали участок NQS в области CDR1 SEQ ID NO: 45. Полученная последовательность CDR-L1 показана в SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 3, или ID NO: 4; полученная последовательность варибельной области легкой цепи показана в SEQ ID NO: 25-36; полученная последовательность варибельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 37-42. Варибельную область легкой цепи связывали с константной областью легкой цепи (SEQ ID NO: 15) для получения соответствующей полноразмерной последовательности легкой цепи; варибельную область тяжелой цепи связывали с константной областью тяжелой цепи (SEQ ID NO: 16) для получения соответствующей полноразмерной последовательности тяжелой цепи. Пригодную гуманизованную последовательность получали путем скрининга аффинности и стабильности. После скрининга аффинности и стабильности информация о полученных последовательностях варибельной области тяжелой цепи и легкой цепи гуманизованных последовательностей показаны в табл.3.

Таблица 3

VL	SEQ ID NO:
Химерные Моноклональные Антитела	10
АН00290 / АН00291/ АН00296	25
АН00293	26
АН00294	27
АН00295 АН00298	28

АН00291-N26Q/ АН00296-N26Q	29
АН00291-N26S/ АН00296-N26S	30
АН00291-S28A/ АН00296-S28A	31
АН00294-N26Q	32
АН00294-N26S	33
АН00294-S28A	34
BMIII	35
BMIV	36

VH	SEQ ID NO:
Химерные Моноклональные Антитела	14
АН00290	37
АН00291 / АН00293/ АН00298/ АН00291-N26Q/ АН00291-N26S/ АН00291-S28A	38
АН00294 / АН00294-N26Q/ АН00294-N26S/ АН00294-S28A	39
АН00295 / АН00296/ АН00296-N26Q/ АН00296-N26S/ АН00296-S28A	40
BMIII	41
BMIV	42

Пример 10. Биологическая активность гуманизированных моноклональных антител против PD-1 человека In Vitro.

Определяли биологическую активность in vitro гуманизированных моноклональных антител против PD-1 человека, включая активность связывания с PD-1 человека и активность блокирования против связывания PD-1/PD-L1. Тестируемые гуманизированные последовательности включали: АН00290, АН00291, АН00293, АН00294, АН00295, АН00296, АН00298, BMIII, BMIV, АН00290-N26Q, АН00291-N26S, АН00291-S28A, АН00294-N26Q, АН00294-N26S, АН00294-S28A, АН00296-N26Q, АН00296-N26S, АН00296-S28A; способом определения был ELISA, и конкретная методика эксперимента была такая же, как в способе определения химерных моноклональных антител против PD-1 человека.

Результат эксперимента показан в табл.4. По сравнению с упомянутыми выше химерными моноклональными антителами против PD-1 человека все тестируемые гуманизированные последовательности сохраняли довольно хорошую активность, демонстрируя сильную активность связывания PD-1 и активность блокирования против связывания PD-1/PD-L1.

Таблица 4. PD-1. Активность связывания и активность блокирования против связывания PD-1/PD-L1 гуманизированных антител против PD-1 человека

Образец	PD-1 Активность связывания (EC <sub>50</sub> , нМ)	PD-1/PD-L1 Активность блокирования (IC <sub>50</sub> , нМ)
Химерные моноклональные антитела	0,031	1,453
АН00290	0,024	1,086
АН00291	0,025	1,105
АН00293	0,026	1,201
АН00294	0,032	1,350
АН00295	0,025	1,188
АН00296	0,027	1,207
АН00298	0,028	1,215
ВМII	0,034	1,197
ВМIV	0,028	1,298
АН00291-N26Q	0,046	1,569
АН00291-N26S	0,039	1,431
АН00291-S28A	0,042	1,361
АН00294-N26Q	0,041	1,491
АН00294-N26S	0,043	1,479
АН00294-S28A	0,047	1,464
АН00296-N26Q	0,044	1,274
АН00296-N26S	0,037	1,066
АН00296-S28A	0,048	1,755

Пример 11. Определение чистоты и термостабильности гуманизированных моноклональных антител против PD-1 человека посредством эксклюзионной высокоэффективной жидкостной.

Хроматографии (SE-HPLC).

Использовали колонку для хроматографии TSKgel SuperSW3000 (номер по каталогу: 0018675). Подвижная фаза составляла 0,1 моль/л фосфатного буфера (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0,1 моль/л сульфатно-натриевого буфера, pH 6,7; скорость потока составляла 0,35 мл/мин; температура колонки составляла 25°C; температура пула образцов составляла 4°C; длина волны детектирования составляла 280 нм. Образец разводили буфером для образца до 1 мг/мл, а объем инъекции составлял 5 мкл. Результат эксперимента обрабатывали с помощью рабочей станции системы 1260 высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent, и чистоту рассчитывали по процентному значению главного пика с использованием метода нормализации площадей. Полученные выше гуманизированные моноклональные антитела против PD-1 человека подвергали анализу чистоты SE-HPLC. Для определения термостабильности этих моноклональных антител образцы помещали в условия высокой температуры, составляющей 40°C, и образцы подвергали анализу SE-HPLC на 2 неделе и 4 неделе, соответственно, для наблюдения за термостабильностью, и результат показан в табл.5 ниже. Все гуманизированные антитела против PD-1 человека демонстрировали хорошую и значительную стабильность за исключением АН00296-S28A.

Таблица 5. Термостабильность гуманизированных моноклональных антител против PD-1 человека при 40°C по SE-HPLC

Гуманизированные Моноклональные антитела против PD-1 человека	Чистота SE-HPLC (%)		
	T=0	2 Неделя	4 Неделя
BMIII	99,2 3	98,16	95,78
BMIV	98,1 9	98,42	94,80
AH00290	98,9 7	98,04	94,73
AH00291	99,3 0	98,22	95,87
AH00293	97,7 9	96,55	94,32
AH00294	98,7 7	97,68	96,52
AH00295	99,2 4	98,16	96,17
AH00296	99,6 3	98,55	96,73
AH00298	99,3 4	98,13	95,87
AH00291-N26Q	98,5 5	98,56	97,90
AH00291-N26S	99,0 5	99,08	98,50
AH00291-S28A	98,9 5	98,89	98,40
AH00294-N26Q	99,1 4	99,08	98,64
AH00294-N26S	99,2 3	99,19	98,64
AH00294-S28A	99,3 0	99,33	98,69
AH00296-N26Q	99,1 0	99,10	98,27
AH00296-N26S	99,6 0	99,59	98,96
AH00296-S28A	99,7 0	84,38	62,42

Пример 12. Определение значения  $T_m$  гуманизированных моноклональных антител против PD-1 человека.

Температуру плавления ( $T_m$ ) гуманизированных моноклональных антител против PD-1 человека определяли посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF). DSF представляет собой способ обнаружения процесса термической денатурации белков в образце за счет использования изменения интенсивности флуоресценции флуоресцентного индикатора для определения температуры денатурации белка. Использовали реагент оранжевый флуоресцентный краситель белка SYPRO (Sigma-Aldrich, USA, номер по каталогу S5692; 5000×концентрация, в DMSO). Машину для ПЦР в реальном времени AB 7500 купали у Applied BioSystems, Inc. USA. Флуоресцентный краситель белка разводили 1:50 буфером для образца, и 1 мкл разведенного красителя перемешивали с 19 мкл раствора белка, так что итоговое разведение флуоресцентного красителя составляло 1:1000. Разведенный флуоресцентный краситель добавляли в 96-луночный планшет, и для каждого образца определяли три параллельных лунки. Планшет герметично закрывали оптической уплотняющей пленкой, центрифугировали при 1000

об./мин в течение 2 мин для удаления пузырьков воздуха. Программу RT-PCR задавали следующим образом: кривую плавления устанавливали в непрерывном режиме, диапазон температуры сканирования составлял 25-99°C, скорость нагрева составляла 1% (приблизительно 1°C/мин), а затем 25°C в течение 2 мин. Данные собирали во время нагрева, репортерную группу устанавливали как "ROX", группу гашения устанавливали как "None", а объем реакции составлял 20 мкл. Концентрация образца составляла 1 мг/мл, а эталонным раствором был буфер для образца. Кривые флуоресценции и первое производное наносили на график с использованием программного обеспечения Protein Thermal Shift™ программное обеспечение v1.3. В тесте DSF среднюю температуру первого перехода белка обычно считают температурой денатурации термостабильности белка. Измеряли значения T<sub>m</sub> гуманизированных моноклональных антител против PD-1 человека, а результат показан в табл.6 ниже. Все гуманизированные моноклональные антитела против PD-1 человека имеют довольно хорошее значение T<sub>m</sub>.

Таблица 6. Значение T<sub>m</sub> гуманизированных моноклональных антител против PD-1 человека

Гуманизированные Моноклональные антитела против PD-1 человека	Значение T <sub>m</sub>
BMIII	70,7°C
BMIV	65,2°C
АН00290	66,5°C
АН00291	67,7°C
АН00293	69,1°C
АН00294	67,9°C
АН00295	70,5°C
АН00296	70,0°C
АН00298	67,9°C
АН00291-N26Q	68,5°C
АН00291-N26S	67,8°C
АН00291-S28A	68,8°C
АН00294-N26Q	66,6°C
АН00294-N26S	65,9°C
АН00294-S28A	68,4°C
АН00296-N26Q	67,6°C
АН00296-N26S	70,1°C
АН00296-S28A	69,1°C

Пример 13. Определение Заряженных изомеров гуманизированных моноклональных антител против PD-1 человека посредством катионообменной хроматографии (СЕХ).

Использовали катионообменную колонку для хроматографии MabPac SCX-10, 4×250 мм (Номер по каталогу: 78655). В качестве подвижной фазы А использовали 20 ммоль/л 2-(N-морфолин) этансульфоновой кислоты (MES) (pH 5,6) и 60 ммоль/л хлорида натрия; в качестве подвижной фазы В использовали 20 ммоль/л MES (pH 5,6) и 300 ммоль/л хлорида натрия. Скорость потока составляла 0,5 мл/мин; температура колонки составляла 25°C; температура пула образцов составляла 4°C; длина волны детектирования составляла 280 нм; объем загружаемого образца составлял 50 мкл (1 мг/мл); элюирование осуществляли в линейном градиенте от 5 до 50% в течение 60 мин. Результат эксперимента обрабатывали с помощью рабочей станции системы 1260 высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent, и процентное значение площади пика рассчитывали методом нормализации площадей. Гуманизированные моноклональные антитела против PD-1 человека подвергали определению СЕХ. Для определения химической стабильности этих моноклональных антител указанные выше образцы помещали в условия высокой температуры, составляющей 40°C, и образцы вынимали на 2 неделе и 4 неделе, соответственно, для определения СЕХ, и смотрели изменения доли заряженных вариантов. Результат показан в таблице 7. Все гуманизированные антитела против PD-1 человека имеют относительно низкую долю заряженных вариантов за исключением АН00296-S28А.

Таблица 7. Изменения заряженных вариантов гуманизированных моноклональных антител против PD-1 человека при 40°C посредством СЕХ

Образец	Изменения заряженных вариантов					
	Т=0			2 Неделя		
	Главный пик (%)	Кислотный пик (%)	Щелочной пик (%)	Главный пик (%)	Кислотный пик (%)	Щелочной пик (%)
BMIII	68,2	18,2	13,6	64,0	22,8	13,2
BMIV	64,9	21,1	14,0	58,0	27,1	14,9
АН00290	65,6	20,1	14,3	61,5	25,8	12,7
АН00291	66,6	20,0	13,4	61,5	24,8	13,7
АН00293	69,2	20,7	10,1	62,6	26,7	10,7
АН00294	68,4	17,8	13,8	63,5	22,3	14,2
АН00295	65,8	17,3	16,9	59,1	24,8	16,1
АН00296	66,9	19,3	13,8	59,7	25,2	15,1
АН00298	66,1	19,4	14,5	62,7	22,2	15,1
АН00291-N26Q	77,2	8,8	14,0	73,8	10,8	15,4
АН00291-N26S	77,6	8,2	14,2	71,6	11,4	17,0
АН00291-S28A	74,6	8,5	16,9	71,9	10,4	17,9
АН00294-N26Q	74,9	7,7	17,4	71,1	10,8	18,1
АН00294-N26S	78,0	7,7	14,3	73,2	11,2	15,6
АН00294-S28A	77,9	7,2	14,9	73,8	7,2	14,9
АН00296-N26Q	78,8	7,4	13,8	72,6	12,4	14,9
АН00296-N26S	76,9	7,3	15,8	70,6	12,6	16,8
АН00296-S28A	78,1	7,4	14,5	54,2	22,9	23,0

В заключение, должно быть понятно, что приведенные выше варианты осуществления необходимо использовать только для представления технического решения настоящего раскрытия вместо его ограничения; хотя настоящее раскрытие было подробно описано со ссылкой на вышеизложенные варианты осуществления, рядовым специалистам в данной области должно быть понятно, что технические решения, описанные в вышеизложенных вариантах осуществления, можно модифицировать, или некоторые или все технические признаки можно равноценно заменить; и модификации или замены, однако, не будут выводить суть соответствующих технических решений за рамки технических решений вариантов осуществления настоящего раскрытия.

Промышленная применимость: антитело и его функциональный фрагмент, предоставленные в настоящем раскрытии, могут специфически связываться с PD-1, и их можно использовать для предотвращения и/или лечения аутоиммунного заболевания (например, артрита, ревматоидного артрита, псориаза, рассеянного склероза, язвенного колита, болезни Крона, системной красной волчанки, гломерулонефрита, заболевания наподобие дилатационной кардиомиопатии, синдрома Шегрена, аллергического контактного дерматита, полимиозита, склеродермии, периартериального полиартрита, ревматической лихорадки, витилиго, инсулинозависимого сахарного диабета, синдрома Бехчета и хронического тиреоидита), иммунного ответа против трансплантата, аллергии, инфекции, нейродегенеративного заболевания (например, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, болезни Мачадо-Джозефа, амиотрофического бокового склероза, болезни Крейтцфельда-Якоба) и опухоли (например, лейкемии, лимфомы, миеломы, опухоли головного мозга, плоскоклеточного рака головы и шеи, немелкоклеточного рака легких, рака носо-

глотки, рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака печени, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака эндометрия, саркомы матки, рака простаты, рака мочевого пузыря, почечно-клеточного рака и меланомы) и т.д.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, способное специфически связываться с PD-1, или его функциональный фрагмент, где указанные антитело или его функциональный фрагмент содержат легкую цепь и тяжелую цепь;

легкая цепь содержит CDR легкой цепи, состоящую из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3; тяжелая цепь содержит CDR тяжелой цепи, состоящую из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3;

аминокислотные последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 1, 5 и 6 или, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 2, 5 и 6 или, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 3, 5 и 6 или, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 4, 5 и 6;

аминокислотные последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 7, 8 и 9.

2. Антитело или его функциональный фрагмент по п.1, которые представляют собой химерное антитело против PD-1 или его функциональный фрагмент, или гуманизированное антитело против PD-1 или его функциональный фрагмент.

3. Антитело или его функциональный фрагмент по п.1 или 2, где указанное антитело содержит любую последовательность константной области, выбранную из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE и IgD человека.

4. Антитело или его функциональный фрагмент по любому из пп.1-4, где указанный функциональный фрагмент содержит одно или более, выбранное из группы, состоящей из F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv и scFv.

5. Антитело или его функциональный фрагмент по п.2, где аминокислотные последовательности вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи химерного антитела против PD-1 или его функционального фрагмента, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 14 или, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 14 или, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 14 или, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14.

6. Антитело или его функциональный фрагмент по п.5, где аминокислотные последовательности константной области легкой цепи и константной области тяжелой цепи химерного антитела против PD-1 или его функционального фрагмента, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16.

7. Антитело или его функциональный фрагмент по п.2, в которых каркасная область легкой цепи гуманизированного антитела против PD-1 или его функционального фрагмента содержит FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, а каркасная область тяжелой цепи гуманизированного антитела против PD-1 или его функционального фрагмента содержит FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4;

FR-L1 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 17, и аминокислотной последовательности, имеющей следующие замещения или их комбинации:

1-я аминокислота D заменена на E,

2-я аминокислота V заменена на I,

13-я аминокислота L заменена на V,

19-я аминокислота A заменена на V;

FR-L2 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 18, и аминокислотной последовательности, имеющей следующие замещения или их комбинации:

6-я аминокислота P заменена на S,

7-я аминокислота G заменена на H,

9-я аминокислота A заменена на S;

FR-L3 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 19, и аминокислотной последовательности, имеющей следующие замещения или их комбинации:

22-я аминокислота L заменена на V,

24-я аминокислота P заменена на T,

28-я аминокислота A заменена на G,

31-я аминокислота F заменена на Y;

FR-L4 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 20, и аминокислотной последовательности, имеющей следующие замещения или их комбинации:

7-я аминокислота V заменена на L;

FR-H1 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 21;

FR-H2 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 22, и аминокислотной последовательности, имеющей следующие замещения или их комбинации:

5-я аминокислота A заменена на T,

14-я аминокислота A заменена на S,

FR-H3 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 23, и аминокислотной последовательности, имеющей следующие замещения или их комбинации:



(г) последовательность варибельной области легкой цепи гуманизованного антитела против PD-1 и его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 36; соответствующая последовательность варибельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 42.

11. Антитело или его функциональный фрагмент по п.7, где аминокислотные последовательности из последовательности константной области легкой цепи и последовательности константной области тяжелой цепи гуманизованного антитела против PD-1 или его функционального фрагмента показаны в SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16, соответственно.

12. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его функциональный фрагмент по любому из пп.1-11.

13. Фармацевтическая композиция для предотвращения или лечения заболевания, при котором экспрессируется PD-1, содержащая антитело или его функциональный фрагмент по любому из пп.1-11 и фармацевтически приемлемый носитель.

14. Конъюгат, содержащий антитело или его функциональный фрагмент по любому из пп.1-11 и по меньшей мере одно терапевтическое средство, где указанное терапевтическое средство соединено с указанным антителом.

15. Конъюгат по п.14, где терапевтическим средством является одно или более, выбранное из группы, состоящей из голого антитела, цитотоксического средства, лекарственного препарата, радионуклида, атома бора, иммуномодулятора, антиапоптоического средства, фотосенсибилизирующего терапевтического средства, иммуноконъюгата и олигонуклеотида.

16. Конъюгат по п.15, где лекарственным препаратом является одно или более, выбранное из группы, состоящей из метотрексата, фторурацила, меркаптопурина, гидроксимочевины, цитарабина, азотистого иприта, циклофосамида, тиотепы, цисплатина, митомицина, блеомицина, камптотецина, подофиллотоксина, актиномицина D, доксорубицина, даунорубицина, винбластина, паклитаксела, алкалоидов головчатого тиса и L-аспарагиназы.

17. Конъюгат по п.15, где олигонуклеотидом является одно или более, выбранное из группы, состоящей из shRNA, miRNA и siRNA.

18. Конъюгат по п.15, где иммуномодулятором является одно или более, выбранное из группы, состоящей из цитокина, хемокина, фактора роста стволовых клеток, лимфотоксина, гематопоезического фактора, колониестимулирующего фактора (CSF), интерферона, эритропоэтина, тромбопоэтина, фактора некроза опухоли (TNF), интерлейкина (IL), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и фактора роста стволовых клеток.

19. Конъюгат по п.15, где радионуклидом является одно или более, выбранное из группы, состоящей из <sup>111</sup>In, <sup>111</sup>At, <sup>177</sup>Lu, <sup>211</sup>Bi, <sup>212</sup>Bi, <sup>213</sup>Bi, <sup>211</sup>At, <sup>62</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>90</sup>Y, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>133</sup>I, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P, <sup>47</sup>Sc, <sup>111</sup>Ag, <sup>67</sup>Ga, <sup>153</sup>Sm, <sup>161</sup>Tb, <sup>152</sup>Dy, <sup>166</sup>Dy, <sup>161</sup>Ho, <sup>166</sup>Ho, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>189</sup>Re, <sup>211</sup>Pb, <sup>212</sup>Pb, <sup>223</sup>Ra, <sup>225</sup>Ac, <sup>77</sup>As, <sup>89</sup>Sr, <sup>99</sup>Mo, <sup>105</sup>Rh, <sup>149</sup>Pm, <sup>169</sup>Er, <sup>194</sup>Ir, <sup>58</sup>Co, <sup>80</sup>mBr, <sup>99</sup>mTc, <sup>103</sup>mRh, <sup>109</sup>Pt, <sup>119</sup>Sb, <sup>189</sup>mOs, <sup>192</sup>Ir, <sup>219</sup>Rn, <sup>215</sup>Po, <sup>221</sup>Fr, <sup>255</sup>Fm, <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O, <sup>75</sup>Br, <sup>198</sup>Au, <sup>199</sup>Au, <sup>224</sup>Ac, <sup>77</sup>Br, <sup>113</sup>mIn, <sup>95</sup>Ru, <sup>97</sup>Ru, <sup>103</sup>Ru, <sup>105</sup>Ru, <sup>107</sup>Hg, <sup>203</sup>Hg, <sup>121</sup>mTe, <sup>122</sup>mTe, <sup>125</sup>mTe, <sup>165</sup>Tm, <sup>167</sup>Tm, <sup>168</sup>Tm, <sup>197</sup>Pt, <sup>109</sup>Pd, <sup>142</sup>Pr, <sup>143</sup>Pr, <sup>161</sup>Tb, <sup>57</sup>Co, <sup>58</sup>Co, <sup>51</sup>Cr, <sup>59</sup>Fe, <sup>75</sup>Se, <sup>201</sup>Tl, <sup>76</sup>Br и <sup>169</sup>Yb.

20. Применение композиции по п.13 для изготовления лекарства для предотвращения или лечения опухоли, при которой экспрессируется PD-1.

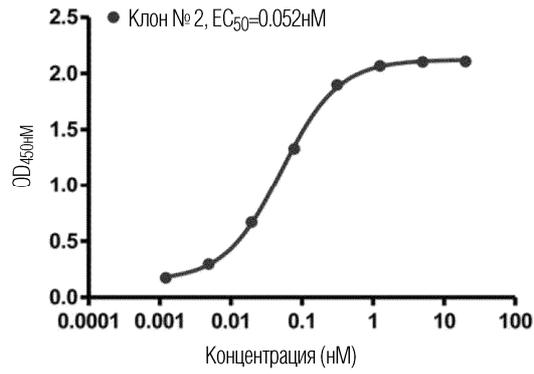
21. Применение конъюгата по любому из пп.14-19 для изготовления лекарства для предотвращения или лечения опухоли, при которой экспрессируется PD-1.

22. Применение антитела или его функционального фрагмента по любому из пп.1-11 для изготовления лекарства для предотвращения или лечения опухоли, при которой экспрессируется PD-1.

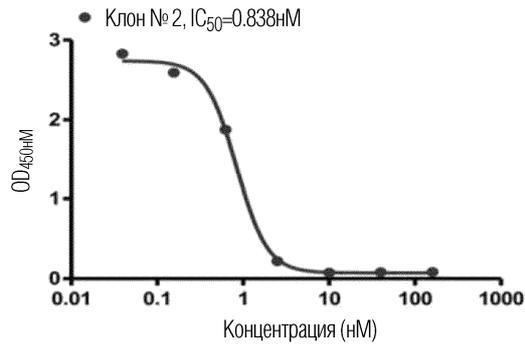
23. Применение по п.22, где опухолью является одно или более, выбранное из группы, состоящей из лейкемии, лимфомы, миеломы, опухоли головного мозга, плоскоклеточного рака головы и шеи, немелкоклеточного рака легких, рака носоглотки, рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака печени, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака эндометрия, саркомы матки, рака простаты, рака мочевого пузыря, почечно-клеточного рака и меланомы.

24. Применение антитела или его функционального фрагмента по любому из пп.1-11 для предотвращения или лечения опухоли, при которой экспрессируется PD-1.

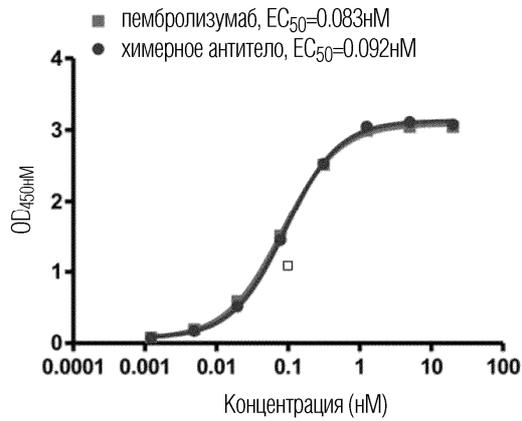
25. Способ предотвращения или лечения опухоли, при которой экспрессируется PD-1, включающий введение антитела или его функционального фрагмента по любому из пп.1-11 нуждающемуся в этом субъекту.



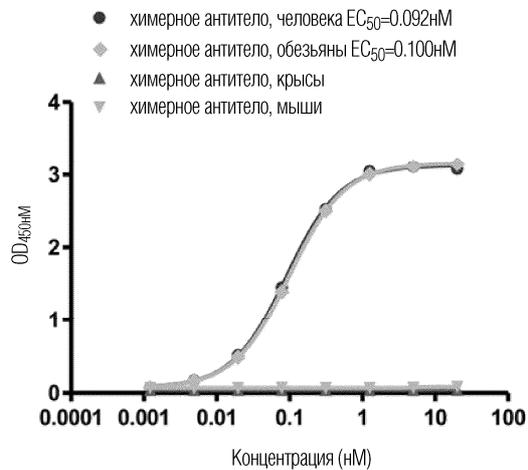
Фиг. 1



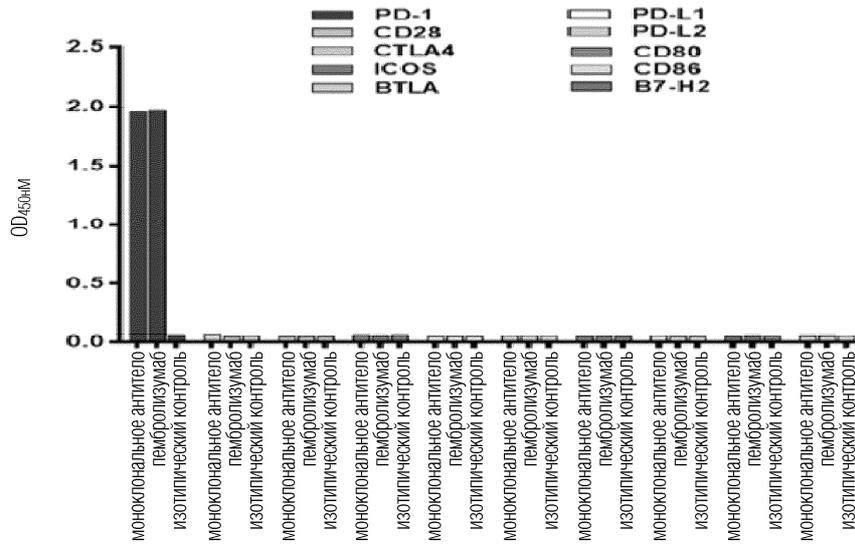
Фиг. 2



Фиг. 3

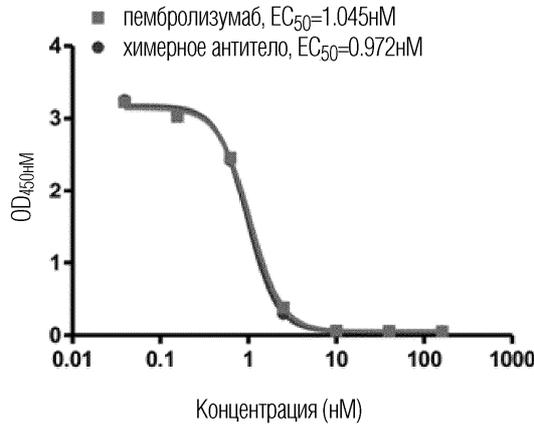


Фиг. 4

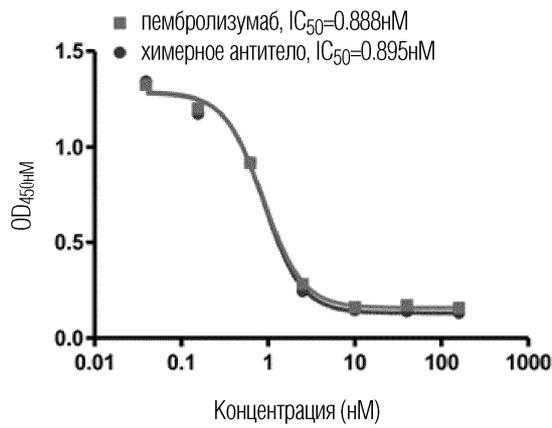


Фиг. 5

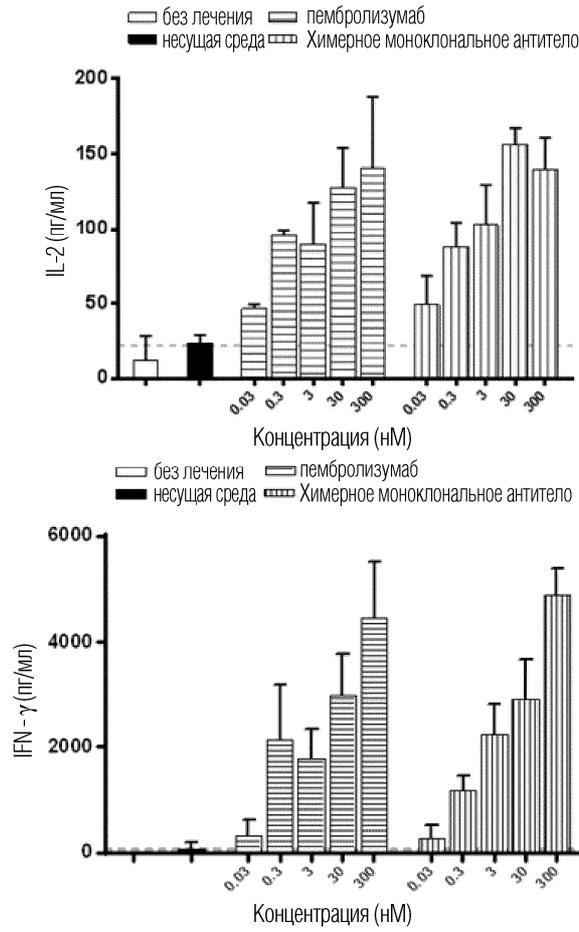
PD-1/PD-L1 Активность блокирования



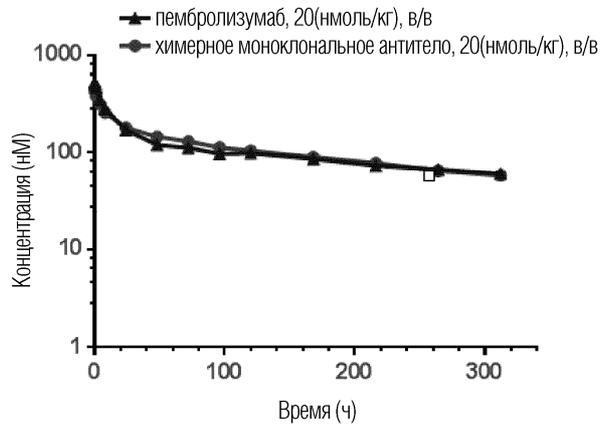
PD-1/PD-L2 Активность блокирования



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

