



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.21

(21) Номер заявки
201890630

(22) Дата подачи заявки
2016.09.01

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

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/212,851; 62/216,043; 62/257,195

(32) 2015.09.01; 2015.09.09; 2015.11.18

(33) US

(43) 2018.10.31

(86) PCT/US2016/049913

(87) WO 2017/040790 2017.03.09

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭЙДЖЕНУС ИНК. (US); ЛЮДВИГ
ИНСТИТЮТ ФОР КЭНСЕР
РИСЕРЧ ЛТД (СН); МЕМОРИАЛ
СЛОАН КЕТТЕРИНГ КЭНСЕР
СЕНТЕР (US)**

(72) Изобретатель:
**Ван Дейк Марк (NL), Мундт
Корнелия Анне (DE), Ритгер Герт,
Волчок Джедд Дэвид, Мергхуб Таха,
Заппасоди Роберта, Холмгард Рикке
Бек, Шаер Дэвид, Савицкий Дэвид
Адам, Уилсон Николас Стюарт (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-2015203579
US-A1-2014356363
WO-A2-2014179664
WO-A1-2008156712
US-A1-2015210769
US-B1-8735553
WO-A1-2006121168
R. MOREIRA DA SILVA: "Nivolumab: Anti-PD-1
monoclonal antibody cancer immunotherapy", DRUGS
OF THE FUTURE, vol. 39, no. 1, 1 January 2014

(2014-01-01), pages 15-24, XP055199597, ES ISSN: 0377-8282, DOI: 10.1358/dof.2014.039.01.2103754 page 17, left-hand column, paragraph 2, page 17, left-hand column, paragraph 4, page 20, right-hand column, paragraph 4

J. MCDERMOTT ET AL.: "Pembrolizumab: PD-1 inhibition as a therapeutic strategy in cancer", DRUGS OF TODAY, vol. 51, no. 1, 1 January 2015 (2015-01-01), page 7, XP055316850, ES ISSN: 1699-3993, DOI: 10.1358/dof.2015.51.1.2250387, the whole document

BENSON D. M. ET AL.: "The PD-1/PD-11 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 116, no. 13, 30 September 2010 (2010-09-30), pages 2286-2294, XP002685329, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BL00D-2010-02-271874 [retrieved on 2010-05-11], page 2286, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 1, page 2290, left-hand column, paragraph 2 - page 2291, right-hand column, paragraph 1

M. SZNOL ET AL.: "Antagonist Antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-11) in the Treatment of Advanced Human Cancer", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 19, no. 5, 1 March 2013 (2013-03-01), pages 1021-1034, XP055123957, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2063, the whole document

Anonymous: "International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (INN)", WHO Drug Information Rec. Wld Health Org. Resolution EB15.R7), 1 January 2014 (2014-01-01), pages 379-422, XP055316833, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.who.int/entity/medicines/publications/duginformation/innlists/RL72.pdf?ua=1> [retrieved on 2016-11-07], page 407

KENT SHIH ET AL.: "Clinical Impact of Checkpoint Inhibitors as Novel Cancer Therapies", DRUGS, vol. 74, no. 17, 25 October 2014 (2014-10-25), pages 1993-2013, XP055316870, NZ ISSN: 0012-6667, DOI: 10.1007/S40265-014-0305-6, the whole document

(57) Изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и антагонизируют функцию PD-1. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, включающим такие антитела, нуклеиновым кислотам, кодирующим такие антитела, экспрессирующим векторам и клеткам-хозяевам для получения таких антител и способам лечения субъекта с использованием таких антител.

Настоящая заявка притязает на преимущество предварительных заявок на патент США №№ 62/212851, поданной 1 сентября 2015; 62/216043, поданной 9 сентября 2015; и 62/257195, поданной 18 ноября 2015, каждая из которых полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

1. Область техники

Настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1, и способам их применения.

2. Уровень техники

Белок программируемой гибели клеток 1 (PD-1) является ингибирующим членом семейства рецепторов CD28. PD-1 экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках (Agata et al. (1996), *Int. Immunol.*, 8: 765-72; Okazaki et al. (2002), *Curr. Opin. Immunol.*, 14: 391779-82; Bennett et al. (2003), *J. Immunol.*, 170: 711-8). PD-1 представляет собой трансмембранный белок типа 1 в 55 кДа, который является частью суперсемейства генов Ig и содержит мембранный проксимальный иммунорецепторный тирозинный ингибирующий мотив (ITIM) и переключающий мотив на основе мембранного дистального тирозина (ITSM) (Thomas M. L. (1995), *J. Exp. Med.*, 181: 1953-6; Vivier E. and Daeron M. (1997), *Immunol. Today*, 18: 286-91). Идентифицированы два лиганда для PD-1 PD-L1 и PD-L2, которые, как показано, даунрегулируют активацию Т-клеток после связывания с PD-1 (Freeman et al. (2000), *J. Exp. Med.*, 192: 1027-34; Latchman et al. (2001), *Nat. Immunol.*, 2: 261-8; Carter et al. (2002), *Eur. J. Immunol.*, 32: 634-43). PD-L1 часто встречается при многих онкозаболеваниях человека (Dong et al. (2002), *Nat. Med.*, 8: 787-9). Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 приводит к снижению опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, снижению пролиферации, опосредуемой Т-клеточными рецепторами, и избеганию раковыми клетками иммунного надзора (Dong et al. (2003), *J. Mol. Med.*, 81: 281-7; Blank et al. (2005), *Cancer Immunol. Immunother.*, 54: 307-314; Konishi et al. (2004), *Clin. Cancer Res.*, 10: 5094-100). Такую иммуносупрессию можно реверсировать путем ингибирования локального взаимодействия PD-1 с PD-L1, и эффект является аддитивным, когда также блокируется взаимодействие PD-1 с PD-L2 (Iwai et al. (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 12293-7; Brown et al. (2003), *J. Immunol.*, 170: 1257-66).

PD-1 является ингибирующей молекулой иммунных клеток. У животных с недостатком PD-1 развиваются различные аутоиммунные фенотипы, включая аутоиммунную кардиомиопатию и волчаночно-подобный синдром с артритом и нефритом (Nishimura et al. (1999), *Immunity*, 11: 141-51; Nishimura et al. (2001), *Science*, 291: 319-22). Кроме того, также обнаружено, что PD-1 играет некую роль в аутоиммунном энцефаломиелите, системной красной волчанке, болезни "трансплантат против хозяина" (GVHD), диабете типа I и ревматоидном артрите (Salama et al. (2003), *J. Exp. Med.*, 198: 71-78; Prokunina and Alarcon-Riquelme (2004), *Hum. Mol. Genet.*, 13: R143; Nielsen et al. (2004), *Lupus*, 13: 510). Показано, что в линии мышиных опухолевых В-клеток ITSM PD-1 существенен для блокады BCR-опосредованного потока Ca^{2+} и фосфорилирования тирозина следующих далее эффекторных молекул (Okazaki et al. (2001), *PNAS*, 98: 13866-71).

Принимая во внимание роль человеческого PD-1 в модулирующих иммунных реакциях, терапевтические средства, созданные для антагонизации передачи сигнала PD-1, считаются весьма перспективными для лечения заболеваний, которые включают иммуносупрессию, опосредуемую PD-1.

3. Сущность изобретения

Настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и антагонизируют функцию PD-1, например опосредуемую PD-1 иммуносупрессию. Настоящее раскрытие также относится к фармацевтическим композициям, включающим такие антитела, нуклеиновым кислотам, кодирующим такие антитела, экспрессирующим векторам и клеткам-хозяевам для получения таких антител, и способам лечения пациента с использованием таких антител. Антитела, раскрытые в настоящем описании, особенно применимы для усиления активации Т-клеток в ответ на антиген (например, опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания) и/или ослабления Treg-опосредуемой иммуносупрессии и, следовательно, для лечения или предупреждения инфекционного заболевания у субъекта.

Соответственно в одном аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему вариативный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, вариативный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем: (a) CDRH1 включает аминокислотную последовательность SYGMH (SEQ ID NO: 1); (b) CDRH2 включает аминокислотную последовательность VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID NO: 32), где X₁ представляет собой Y или F; X₂ представляет собой K или E и X₃ представляет собой K или M; (c) CDRH3 включает аминокислотную последовательность NX₁DX₂ (SEQ ID NO: 33), где X₁ представляет собой G или V и X₂ представляет собой H или Y; (d) CDRL1 включает аминокислотную последовательность RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4); (e) CDRL2 включает аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 5) и (f) CDRL3 включает аминокислотную последовательность QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).

В некоторых воплощениях CDRH2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 2 и 34-46.

В некоторых воплощениях CDRH3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему: (а) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему: (а) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему: (а) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему: (а) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему: (а) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему: (а) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему вариативный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариативный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем: (а) CDRH1 включает аминокислотную последовательность SYGMH (SEQ ID NO: 1); (b) CDRH2 включает аминокислотную последовательность VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID NO: 32), где X₁ представляет собой Y или F; X₂ представляет собой K или E; и X₃ представляет собой K или M; (c) CDRH3 включает аминокислотную последовательность NX₁DX₂ (SEQ ID NO: 33), где X₁ представляет собой G или V; и X₂ представляет собой H или Y; (d) CDRL1 включает аминокислотную последовательность RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4); (e) CDRL2 включает аминокислотную последовательность GAS-TRAT (SEQ ID NO: 5) и (f) CDRL3 включает аминокислотную последовательность QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).

В некоторых воплощениях CDRH2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 2 и 34-36.

В некоторых воплощениях CDRH3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 3, 7 и 37.

В некоторых воплощениях CDRH1, CDRH2 и CDRH3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, соответственно, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3; 1, 2 и 7; 1, 2 и 37; 1, 34 и 7; 1, 35 и 7 или 1, 36 и 7.

В некоторых воплощениях антитело включает вариативный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариативный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6 соответственно.

В некоторых воплощениях антитело включает вариативный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариативный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 7, 4, 5 и 6 соответственно.

В некоторых воплощениях антитело включает вариативный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

В некоторых воплощениях антитело включает вариативный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31. В некоторых воплощениях вариативный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31. В некоторых воплощениях вариативный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В некоторых воплощениях вариативный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых воплощениях вариативный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26. В некоторых воплощениях вариативный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В некоторых воплощениях вариативный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. В некоторых воплощениях вариативный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В некоторых воплощениях вариативный участок тяжелой цепи включает

[illegible]

В некоторых воплощениях антитело включает вариабельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGHV3-33 (например, IGHV3-33*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50).

В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях переменный участок легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGKV3-15 (например, IGKV3-15*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51).

В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, где переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, соответственно, включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 15 и 16; 17 и 16; 26 и 16; 27 и 16; 28 и 16; 29 и 16; 30 и 16 или 31 и 16.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему: (a) вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и (b) вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему: (a) вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и (b) вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему: (a) вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и (b) вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему: (a) вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и (b) вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему: (a) вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и (b) вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему: (a) вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и (b) вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

изолированному антителу, которое связывается, например, специфически связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и любое антитело по настоящему изобретению, для которого, после связывания антитела с человеческим белком PD-1 с последующим добавлением дейтерия, обмен водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в участке, включающем остатки 5-22 SEQ ID NO: 74, существенно снижен относительно обмена водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в том же участке в отсутствие антитела при определении путем обмена водород/дейтерий. В более предпочтительном воплощении после связывания антитела с человеческим белком PD-1 с последующим добавлением дейтерия, обмен водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в участке, включающем остатки 107-122 SEQ ID NO: 74, существенно снижен относительно обмена водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в том же участке в отсутствие антитела при определении путем обмена водород/дейтерий, и после связывания антитела с человеческим белком PD-1 с последующим добавлением дейтерия, обмен водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в участке, включающем остатки 5-22 SEQ ID NO: 74, существенно снижен относительно обмена водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в том же участке в отсутствие антитела при определении путем обмена водород/дейтерий. Например, связывание с более чем одной из вышеуказанных последовательностей эпитопов человеческого PD-1 может происходить в случае прерывистых эпитопов.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое связывается, например, специфически связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и любое антитело по настоящему изобретению, причем эпитоп определяют по обмену водород-дейтерий (HDX), в частности, как описано в примерах, или анализом Pepscan, в частности, как описано в примерах, предпочтительнее по обмену водород-дейтерий.

Следующие далее воплощения применимы ко всем вышеуказанным аспектам.

В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, выбранный из группы, включающей человеческие IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁, который теряет гликановую группу в позиции N297 согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁, включающего мутацию N297A согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁, включающего мутацию N297Q согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁, включающего мутацию D265A согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₄, включающего мутацию S228P согласно нумерации системы EU.

В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG, который является вариантом константного участка тяжелой цепи человеческого IgG дикого типа, причем вариантный константный участок тяжелой цепи человеческого IgG связывается с человеческим Fc-рецептором с меньшей аффинностью, чем связывается константный участок тяжелой цепи человеческого IgG дикого типа с человеческим Fc-рецептором. В некоторых воплощениях человеческий Fc-рецептор представляет собой FcγR. В некоторых воплощениях FcγR представляет собой FcγRIIB. В некоторых воплощениях FcγR экспрессируется на клетке, выбранной из группы, включающей дендритные клетки, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, гранулоциты, В-клетки и природные киллерные клетки. В некоторых воплощениях вариантный константный участок тяжелой цепи человеческого IgG представляет собой вариант константного участка тяжелой цепи человеческого IgG₁, вариант константного участка тяжелой цепи человеческого IgG₂ или вариант константного участка тяжелой цепи человеческого IgG₄. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из человеческих IgGκ IgGλ.

В некоторых воплощениях антитело представляет собой человеческое антитело. В некоторых воплощениях антитело является антагонистичным к человеческому PD-1. В некоторых воплощениях антитело дезактивирует, снижает или ингибирует активность человеческого PD-1. В некоторых воплощениях антитело ингибирует связывание человеческого PD-1 с человеческим PD-L1 или с человеческим PD-L2. В некоторых воплощениях антитело повышает продуцирование IL-2 мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC), стимулированными стафилококковым энтеротоксином A (SEA). В некоторых воплощениях антитело повышает продуцирование IFNγ совместной культурой человеческих Т-клеток и аллогенных дендритных клеток. В некоторых воплощениях антитело повышает пролиферацию анти-CD3-антителостимулированных CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток, культивированных вместе с асцитической жидкостью при раке яичников. В некоторых воплощениях антитело усиливает передачу сигнала NFAT в PD-1-экспрессирующих NFAT-люциферазных репортерных клетках, культивированных совместно с PD-L1-экспрессирующими клетками-мишенями.

В некоторых воплощениях антитело, раскрытое в настоящем описании, конъюгируют с цитотоксическим агентом, цитостатическим агентом, токсином, радионуклидом или детектируемой меткой.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к фармацевтической композиции, включающей антитело, раскрытое в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к полинуклеотиду или изолированному полинуклеотиду, кодирующему тяжелую и/или легкую цепь антитела, раскрытого в настоящем описании. В другом аспекте настоящее раскрытие относится к вектору, включающему полинуклеотид. В еще одном аспекте настоящее раскрытие относится к рекомбинантной клетке-хозяину, включающей полинуклеотид или вектор. В другом аспекте настоящее раскрытие относится к способу получения антитела, которое связывается с человеческим PD-1, причем способ включает культивирование клетки-хозяина таким образом, что экспрессируется полинуклеотид и продуцируется антитело. В предпочтительном воплощении способ является способом *in vitro*.

В одном воплощении настоящее изобретение относится к антителу по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению или полинуклеотиду по изобретению или вектору по изобретению или рекомбинантной клетке-хозяину по изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

В одном воплощении настоящее изобретение относится к антителу по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению или полинуклеотиду по изобретению или вектору по изобретению или рекомбинантной клетке-хозяину по изобретению для применения в качестве диагностического средства.

В одном воплощении настоящее изобретение относится к применению антитела по настоящему изобретению для получения фармацевтических композиций или лекарственных средств для иммунотерапии. Предпочтительно иммунотерапия предназначена для повышения активности Т-клеток, необязательно для лечения рака или лечения или предупреждения инфекционного заболевания.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к способу повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, причем способ включает введение субъекту эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем описании.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к способу лечения рака у субъекта, причем способ включает введение субъекту эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем описании. В некоторых воплощениях рак выбирают из группы, включающей меланому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), рак легких (например, немелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак молочной железы (например, устойчивый к герцептину рак молочной железы и устойчивый к трастузумабу-DM1 (T-DM1) рак молочной железы), рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, колоректальный рак, саркому, рак мочевого пузыря, цервикальный рак, HPV-ассоциированные раковые заболевания, раковые заболевания влагалища, раковые заболевания вульвы, раковые заболевания пениса, раковые заболевания ануса, раковые заболевания прямой кишки, раковые заболевания ротоглотки, множественную миелому, почечно-клеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, эндометриальный рак, панкреатический рак, лимфому и лейкоз (например, лейкоз у пожилых, острый миелоидный лейкоз (AML) и AML у пожилых). В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию вводят подкожно или внутривенно. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию вводят интратуморально. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию доставляют в дренирующий опухоль лимфоузел. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию вводят интраартериально.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе повышения активации Т-клеток в ответ на антиген.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для применения в способе повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, включающем введение субъекту эффективного количества антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции по изобретению.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе лечения рака, причем предпочтительно рак выбирают из группы, включающей меланому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), рак легких (например, немелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак молочной железы (например, устойчи-

вый к герцептину рак молочной железы и устойчивый к трастузумабу-DM1 (Т-DM1) рак молочной железы), рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, колоректальный рак, саркому, рак мочевого пузыря, цервикальный рак, HPV-ассоциированные раковые заболевания, раковые заболевания влагалища, раковые заболевания вульвы, раковые заболевания пениса, раковые заболевания ануса, раковые заболевания прямой кишки, раковые заболевания ротоглотки, множественную миелому, почечно-клеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, эндометриальный рак, панкреатический рак, лимфому и лейкоз (например, лейкоз у пожилых, острый миелоидный лейкоз (AML) и AML у пожилых).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе лечения рака у субъекта, причем предпочтительно рак выбирают из группы, включающей меланому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), рак легких (например, немелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак молочной железы (например, устойчивый к герцептину рак молочной железы и устойчивый к трастузумабу-DM1 (Т-DM1) рак молочной железы), рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, колоректальный рак, саркому, рак мочевого пузыря, цервикальный рак, HPV-ассоциированные раковые заболевания, раковые заболевания влагалища, раковые заболевания вульвы, раковые заболевания пениса, раковые заболевания ануса, раковые заболевания прямой кишки, раковые заболевания ротоглотки, множественную миелому, почечно-клеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, эндометриальный рак, панкреатический рак, лимфому и лейкоз (например, лейкоз у пожилых, острый миелоидный лейкоз (AML) и AML у пожилых).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе лечения рака у субъекта, включающем введение субъекту эффективного количества антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции по изобретению, причем предпочтительно рак выбирают из группы, включающей меланому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), рак легких (например, немелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак молочной железы (например, устойчивый к герцептину рак молочной железы и устойчивый к трастузумабу-DM1 (Т-DM1) рак молочной железы), рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, колоректальный рак, саркому, рак мочевого пузыря, цервикальный рак, HPV-ассоциированные раковые заболевания, раковые заболевания влагалища, раковые заболевания вульвы, раковые заболевания пениса, раковые заболевания ануса, раковые заболевания прямой кишки, раковые заболевания ротоглотки, множественную миелому, почечно-клеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, эндометриальный рак, панкреатический рак, лимфому и лейкоз (например, лейкоз у пожилых, острый миелоидный лейкоз (AML) и AML у пожилых).

В предпочтительном воплощении антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции для применения по настоящему изобретению антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию, предпочтительно антитело или фармацевтическую композицию, вводят подкожно или внутривенно. В другом предпочтительном воплощении антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции для применения по настоящему изобретению, антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию, предпочтительно антитело или фармацевтическую композицию вводят интратуморально или интраартериально.

В некоторых воплощениях вышеуказанные способы также включают введение субъекту дополнительного терапевтического средства. Поэтому в одном предпочтительном воплощении антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции для применения в способе по настоящему изобретению способ также включает введение субъекту дополнительного терапевтического средства.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству для применения в качестве лекарственного средства.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству для применения в способе лечения рака.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или комплексу частей, включающим (а) антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и (b) дополнительное терапевтическое средство.

В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое или средство, направленно воздействующее на контрольную точку. В некоторых воплощениях средство, направленно воздействующее на контрольную точку, выбирают из группы, включающей антагонистическое анти-PD-1 антитело, антагонистическое анти-PD-L1 антитело, антагонистическое анти-PD-L2 антитело, антагонистическое анти-CTLA-4 антитело, антагонистическое анти-TIM-3 антитело, антагонистическое анти-LAG-3 антитело, антагонистическое анти-CEACAM1 антитело, антагонисти-

ческое анти-TIGIT антитело, антагонистическое анти-CD137 антитело, антагонистическое анти-ICOS антитело, антагонистическое анти-GITR антитело и антагонистическое анти-OX40 антитело. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO). В некоторых воплощениях ингибитор выбирают из группы, включающей эпакадостат, F001287, индоксимод и NLG919. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой вакцину. В некоторых воплощениях вакцина включает комплекс белка теплового шока с пептидом (HSPPC), включающий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом. В некоторых воплощениях белком теплового шока является hsc70 и находится в комплексе с опухоль-ассоциированным антигенным пептидом. В некоторых воплощениях белком теплового шока является белок др9б и находится в комплексе с опухоль-ассоциированным антигенным пептидом, причем HSPPC происходит из опухоли, полученной от субъекта. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство включает TCR. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой растворимый TCR. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой клетку, экспрессирующую TCR. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой антитело, которое специфически связывается с комплексом пептид-MHC. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой адъювант. В одном аспекте настоящее изобретение относится к (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, а также их применению для получения лекарственных средств и (b) вакцине для применения в качестве лекарственного средства, в частности, для применения в способе лечения рака, причем предпочтительно вакцина включает комплекс белка теплового шока с пептидом (HSPPC), включающий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом. В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или комплексу частей, включающим (а) антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и (b) вакцину, причем предпочтительно вакцина включает комплекс белка теплового шока с пептидом (HSPPC), включающий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом.

4. Краткое описание чертежей

Фиг. 1A, 1B, 1C и 1D представляют собой графики, показывающие связывание анти-PD-1 антител с активированными первичными Т-клетками человека или яванского макака при измерении проточной цитометрией. Вычисляют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) и строят график зависимости от интервала концентраций антител. На фиг. 1A измеряют связывание AGEN2046w, AGEN2047w и изотипического контрольного человеческого IgG₁ с человеческими CD4⁺ Т-клетками, стимулированными стафилококковым энтеротоксином А (SEA). AGEN2034w и изотипический контрольный человеческий IgG₄ испытывают против человеческих CD4⁺ Т-клеток, стимулированных SEA (фиг. 1B и 1D), и CD4⁺ Т-клеток яванского макака, стимулированных стафилококковым энтеротоксином В (SEB) (фиг. 1C).

Фиг. 2 представляет собой график, показывающий связывание AGEN2034w с человеческим PD-1-Fc, человеческим ROBO2-Fc, человеческим B7-H7-Fc или SIRPγ-His. Взаимодействие измеряют по технологии "suspension array" и строят график зависимости средней интенсивности флуоресценции (MFI) от концентрации антитела.

Фиг. 3A, 3B, 3C, 3D, 3E и 3F представляют собой графики, показывающие процент связывания рекомбинантных PD-L1-Fc и/или PD-12-Fc с гранулами, связанными с PD-1, в присутствии титрования дозы анти-PD-1 антител. На фиг. 3A, 3B, 3C и 3D испытываемыми анти-PD-1 антителами являются AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w и AGEN2047w соответственно. На фиг. 3E и 3F подобные результаты показаны для AGEN2034w и изотипического контрольного антитела.

Фиг. 4A, 4B, 4C, 4D, 4E и 4F представляют собой графики, отображающие функциональную активность анти-PD-1 антител на культурах первичных человеческих PBMC после стимуляции SEA. Фиг. 4A представляет собой график, показывающий продуцирование IL-2, индуцированное анти-PD-1 антителами AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w и изотипическим контрольным IgG₁. Показаны средние величины (величины ошибок) секретированного IL-2. Фиг. 4B представляет собой график, показывающий продуцирование IL-2 в присутствии титрования дозы AGEN2034w по сравнению с изотипическим контролем. Величины ошибок представляют стандартное отклонение. AGEN2034w или контрольное изотипическое антитело проверяют в присутствии или в отсутствие анти-CTLA-4 антитела ипилимумаба (фиг. 4C), анти-TIGIT антитела rab2197 или rab2196 (фиг. 4D), анти-CD137 антитела rab2225 (фиг. 4E) или анти-OX40 антитела rab1928 (фиг. 4F).

Фиг. 5A, 5B и 5C являются результатами исследований при проверке влияния сцепления рецептора Fc-гамма (FcγR) на антагонистическую активность анти-PD-1 антител в отношении первичных человеческих PBMC после стимуляции SEA. Фиг. 5A представляет собой график, показывающий продуцирование IL-2, стимулированное эталонным анти-PD-1 антителом или изотипическим контролем в присутствии или в отсутствие анти-CD16 антитела. Фиг. 5B является результатом подобного исследования по провер-

ке секреции IL-2, индуцированной AGEN2034w или изотипическим контролем в присутствии изотипического контроля, анти-CD16 антитела, анти-CD32 антитела или анти-CD64 антитела. Фиг. 5C представляет собой график, показывающий продуцирование IL-2, индуцированное AGEN2047w с Fc-участком человеческого IgG₁ дикого типа, тремя соответствующими мутантами Fc (N297A, S267E/L328F и S239D/A330L/I332E) и их соответствующими изотипическими контролями. Показаны средние величины (величины ошибок) секретируемого IL-2.

Фиг. 6 представляет собой график, показывающий продуцирование IFN γ совместной культурой человеческих Т-клеток и аллогенных дендритных клеток в отсутствие какого-либо антитела или в присутствии изотипического контрольного антитела или анти-PD-1 антитела AGEN2034w. Показаны средние величины (величины ошибок) IFN γ .

Фиг. 7A, 7B и 7C являются результатами анализов по измерению пролиферации стимулированных анти-CD3-антителом Т-клеток после совместного культивирования с асцитической жидкостью при раке яичников в присутствии AGEN2034w или изотипического контрольного антитела. Фиг. 7A и 7B представляют собой характерные гистограммы, показывающие флуоресценцию CFSE от CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, соответственно, в присутствии AGEN2034w или изотипического контрольного антитела в концентрации 10 мкг/мл. Фиг. 7C представляет собой график, показывающий результаты подобного исследования. На фиг. 7C пролиферация CD4⁺ Т-клеток при измерении путем разведения CFSE нормализована к пролиферации CD4⁺ Т-клеток в отсутствие асцитической жидкости при раке яичников, и построен график в зависимости от концентраций антитела.

Фиг. 8 представляет собой график, показывающий реакцию в репортерном анализе Юрката-NFAT-люцифераза, вызванную анти-PD-1 антителом AGEN2034w или изотипическим контрольным антителом IgG₄. Реакцию, измеренную по экспрессии люциферазы, нормализуют к реакции, вызванной в присутствии изотипического контрольного антитела при наименьшей испытываемой концентрации (свернутая индукция), и строят график в зависимости от концентраций антитела.

Фиг. 9A, 9B, 9C, 9D, 9E и 9F представляют собой графики, показывающие процент связывания рекомбинантных PD-L1-Fc и PD-12-Fc с гранулами, соединенными с PD-1, в присутствии титрования дозы анти-PD-1 антител AGEN2001w (фиг. 9A), AGEN2002W (фиг. 9B), EP11_pl1_B03 (фиг. 9C), EP11_pl1_B05 (фиг. 9D), EP11_pl1_C02 (фиг. 9E) или EP11_pl1_C03 (фиг. 9F).

Фиг. 10 представляет собой график, отображающий функциональную активность анти-PD-1 антитела AGEN2002w или изотипического контрольного IgG₁ на культурах первичных человеческих PBMC после стимуляции SEA, показанной по продуцированию IL-2. Показаны средние величины (величины ошибок) секретируемого IL-2.

5. Подробное описание

Настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и антагонизируют функцию PD-1, например, опосредованную PD-1 иммуносупрессию. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, включающим такие антитела, нуклеиновым кислотам, кодирующим такие антитела, экспрессирующим векторам и клеткам-хозяевам для получения таких антител и способам лечения субъекта с использованием таких антител. Антитела, раскрытые в настоящем описании, особенно применимы для усиления активации Т-клеток в ответ на антиген (например, опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания) и, следовательно, для лечения рака у субъекта или лечения или предупреждения инфекционного заболевания у субъекта. Все примеры "изолированных антител", описанные в настоящем описании, дополнительно рассматриваются как антитела, которые можно изолировать, но не без необходимости. Все примеры "изолированных полинуклеотидов", описанные в настоящем описании, дополнительно рассматриваются как полинуклеотиды, которые можно изолировать, но не без необходимости. Все примеры "антител", описанные в настоящем описании, дополнительно рассматриваются как антитела, которые можно изолировать, но не без необходимости. Все примеры "полинуклеотидов", описанные в настоящем описании, дополнительно рассматриваются как полинуклеотиды, которые можно изолировать, но не без необходимости.

5.1. Определения

Используемые в настоящем описании термины "примерно" и "приблизительно", когда используются для модификации числовой величины или числового интервала, показывают, что отклонения в до 5%-10% выше и до 5%-10% ниже величины или интервала остаются в рамках предполагаемого значения названной величины или интервала.

Используемый в настоящем описании термин "PD-1" относится к белку программируемой гибели клеток 1. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности PD-1 хорошо известны в технике. Пример аминокислотной последовательности человеческого PD-1 представлен в депозите GenBank GI: 167857792.

Используемые в настоящем описании термины "антитело" и "антитела" включают полноразмерные антитела, антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных антител и молекулы, включающие участки антитела CDR, VH или VL. Примеры антител включают моноклональные антитела, полученные рекомбинантно антитела, моносpezifические антитела, мультисpezifические антитела (включая бисpezifиче-

ческие антитела), человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, включающие молекулы с двумя тяжелыми цепями и двумя легкими цепями, легкоцепной мономер антитела, тяжелоцепной мономер антитела, легкоцепной димер антитела, тяжелоцепной димер антитела, пару легкоцепное-тяжелоцепное антитело, интратела, гетероконъюгаты антител, конъюгаты антитело-лекарство, однодоменные антитела, моновалентные антитела, одноцепные антитела или одноцепные Fvs (scFV), камелизованные антитела, аффите-ла, фрагменты Fab, фрагменты F(ab)'₂, дисульфидсоединенные Fvs (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, антианти-Id антитела) и антигенсвязывающие фрагменты любых из указанных выше антител. В некоторых воплощениях антитела, описанные в настоящем описании, относятся к популяциям поликлональных антител. Антитела могут быть любым типом (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любым классом (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂) или любым подклассом (например, IgG_{2a} или IgG_{2b}) молекулы иммуноглобулина. В некоторых воплощениях антитела, описанные в настоящем описании, являются антителами IgG или его класса (например, человеческим IgG₁ или IgG₄) или подкласса. В конкретном воплощении антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело. В конкретном воплощении антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело. В некоторых воплощениях антитело, описанное в настоящем описании, представляет собой антитело IgG1 или IgG2.

Используемые в настоящем описании термины "VH участок" и "VL участок" относятся к отдельным вариабельным участкам тяжелой и легкой цепи антитела, соответственно, включая FR (каркасные участки) 1, 2, 3 и 4 и CDR (определяющие комплементарность участки) 1, 2 и 3 (см. статью Kabat et al., (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (NIH Publication No. 91-3242, Bethesda), полностью включенную в настоящее описание в качестве ссылки).

Используемый в настоящем описании термин "CDR" или "определяющий комплементарность участок" обозначает непоследовательные антигенсвязывающие сайты, обнаруженные в вариабельном участке как тяжелоцепных, так и легкоцепных полипептидов. Такие определенные участки описаны в статьях Kabat et al., *J. Biol. Chem.*, 252, 6609-6616 (1977), и Kabat et al., *Sequences of protein of immunological interest* (1991); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987), и MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 262: 732-745 (1996), полностью включенных в настоящее описание в качестве ссылок, где определения включают перекрывающиеся или подмножества аминокислотных остатков при сравнении одних с другими. Предпочтительно термин "CDR" относится к CDR по определению Кабат, основанном на сравнениях последовательностей. CDRH1, CDRH2 и CDRH3 обозначают CDR тяжелой цепи, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 обозначают CDR легкой цепи.

Используемый в настоящем описании термин "нумерация системы EU" относится к решению EU по нумерации для константных участков антитела, описанному в Edelman G.M. et al., *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969), и Kabat et al., в "*Sequences of Proteins of Immunological Interest*", U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991, полностью включенных в настоящее описание в качестве ссылок.

Используемый в настоящем описании термин "аминокислотные остатки каркаса (FR)" относится к аминокислотам в каркасном участке цепи иммуноглобулина. Термин "каркасный участок" или "FR участок", используемый в настоящем описании, включает аминокислотные остатки, которые являются частью вариабельного участка, но не являются частью CDR (например, с использованием определения CDR по Кабат).

Используемые в настоящем описании термины "вариабельный участок" и "вариабельный домен" используются взаимозаменяемо и являются обычными в технике. Вариабельный участок типично относится к части антитела, как правило, части легкой или тяжелой цепи, типично примерно 110-125 аминоконцевым аминокислотам в зрелой тяжелой цепи и примерно 90-115 аминокислотам в зрелой легкой цепи, которые значительно различаются по последовательности среди антител и используются в связывании и специфичности определенного антитела для его определенного антигена. Вариабельность в последовательности концентрируется в таких участках, называемых определяющими комплементарность участками (CDR), в то время как более консервативные участки в вариабельном домене называют каркасными участками (FR). В некоторых воплощениях вариабельный участок является человеческим вариабельным участком. В некоторых воплощениях вариабельный участок включает CDR грызуна или мыши и человеческие каркасные участки (FR). В отдельных воплощениях вариабельный участок является вариабельным участком примата (например, примата, не являющегося человеком). В некоторых воплощениях вариабельный участок включает CDR грызуна или мыши и каркасные участки примата (FR) (например, примата, не являющегося человеком).

Термины "VL" и "VL домен" используются взаимозаменяемо в отношении вариабельного участка легкой цепи антитела.

Термины "VH" и "VH домен" используются взаимозаменяемо в отношении вариабельного участка тяжелой цепи антитела.

Используемый в настоящем описании термины "константный участок" и "константный домен" используются взаимозаменяемо и являются обычными в технике. Константный участок представляет собой часть антитела, например, карбоксиконцевую часть легкой и/или тяжелой цепи, который не вовлекается

непосредственно в связывание антитела с антигеном, но который может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc рецептором (например, с Fc-гамма рецептором). Константный участок молекулы иммуноглобулина как правило имеет более консервативную аминокислотную последовательность относительно вариабельного домена иммуноглобулина.

Используемый в настоящем описании термин "тяжелая цепь", когда используется в отношении антитела, может относиться к любому определенному типу, например, альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), на основании аминокислотной последовательности константного домена, который дает начало классам IgA, IgD, IgE, IgG и IgM антител, соответственно, включая подклассы IgG, например IgG₁, IgG₂, IgG₃ and IgG₄.

Используемый в настоящем описании термин "легкая цепь", когда используется в отношении антитела, может относиться к любому определенному типу, например, каппа (κ) или лямбда (λ), на основании аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легких цепей хорошо известны в технике. В конкретных воплощениях легкая цепь является человеческой легкой цепью. "Аффинность связывания" обычно относится к силе суммы всех нековалентных взаимодействий между отдельным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, при использовании в настоящем описании "аффинность связывания" относится к истинной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X в отношении его партнера Y можно, как правило, представить константой диссоциации (K_D). Аффинность можно измерить и/или выразить рядом путей, известных в технике, включая, но без ограничения, константу равновесия диссоциации (K_D), и константу равновесия ассоциации (K_A). K_D вычисляют из отношения k_{off}/k_{on} , в то время, как K_A вычисляют из отношения k_{on}/k_{off} . k_{on} относится к константе скорости ассоциации, например, антитела с антигеном, и k_{off} относится к константе скорости диссоциации, например, антитела с антигеном. Определить k_{on} и k_{off} можно методами, известными специалисту в данной области техники, такими как BIAcore® или KinExA.

Используемый в настоящем описании термин "специфически связывается с" относится к способности антитела связываться с антигеном с константой диссоциации (K_d) по меньшей мере примерно 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M или меньше, и/или связываться с антигеном с аффинностью по меньшей мере в два раза большей, чем его аффинность в отношении неспецифического антигена. В одном воплощении молекула, которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, как правило, с меньшей аффинностью при определении, например, иммуноанализами, BIAcore®, с прибором KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID) или другими анализами, известными в технике. В одном воплощении молекула, которая специфически связывается с антигеном, связывается с антигеном с константой ассоциации (K_A), которая по меньшей мере в $\log 2$, $\log 2,5$, $\log 3$, $\log 4$ или больше раз больше, чем K_A , когда молекула связывается неспецифически с другим антигеном. В одном воплощении молекула, которая специфически связывается с антигеном, связывается с антигеном с K_d 1×10^{-6} M или меньше, 1×10^{-7} M или меньше, 1×10^{-8} M или меньше, 1×10^{-9} M или меньше, 1×10^{-10} M или меньше, 1×10^{-11} M или меньше или 1×10^{-12} M или меньше.

В другом конкретном воплощении молекулы, которые специфически связываются с антигеном, не взаимодействуют перекрестно с другими белками в схожих условиях связывания. В другом конкретном воплощении молекулы, которые специфически связываются с PD-1, не взаимодействуют перекрестно с другими не-PD-1 белками. В конкретном воплощении настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с PD-1 (например, человеческим PD-1) с большей аффинностью, чем с другим неродственным антигеном. В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с PD-1 (например, человеческим PD-1) с аффинностью на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или больше более высокой, чем с другим неродственным антигеном при измерении, например, методом радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или кинетического эксклюзионного анализа. В конкретном воплощении степень связывания анти-PD-1 антитела, описанного в настоящем описании, с неродственным не-PD-1 белком, меньше на 10%, 15% или 20% связывания антитела с белком PD-1 при измерении, например, методом радиоиммуноанализа.

При использовании в настоящем описании "эпитоп" является термином, известным в технике, и относится к локализованному участку антигена, с которым может специфически связываться антитело. Эпитоп может представлять собой, например, последовательные аминокислоты полипептида (линейный или последовательный эпитоп), или эпитоп может, например, получаться вместе из двух или большего числа непоследовательных участков полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный или непоследовательный эпитоп). В некоторых воплощениях эпитоп, с которым связывается антитело, можно определить с помощью, например, ЯМР спектроскопии, исследований методом рентгеновской кристаллографии, анализов ELISA, обмена водород/дейтерий в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией с распылением электронов), сканирующего анализа с олигопептидами на основе матрицы (например, ограничивающими пептидами с использовани-

ем CLIPS (Chemical Linkage of Peptides onto Scaffolds) для картирования прерывистых или конформационных эпитопов) и/или картирования при мутагенезе (например, картирование при сайтнаправленном мутагенезе). В случае рентгеновской кристаллографии кристаллизацию можно выполнять с использованием любого метода, известного в технике (например, Giegé R. et al. (1994), *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 50 (Pt 4): 339-350; McPherson A. (1990), *Eur. J. Biochem.*, 189: 1-23; Chayen NE (1997), *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A. (1976), *J. Biol. Chem.*, 251: 6300-6303, все работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок). Кристаллы антитело:антиген можно исследовать с использованием хорошо известных методов рентгенографии и можно уточнить с использованием компьютерной программы, такой как X-PLOR (Yale University, 1992, распространяемой Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth. Enzymol.* (1985), volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW et al.; U.S. 2004/0014194), и BUSTER (Bricogne G. (1993), *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G. (1997), *Meth. Enzymol.*, 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P. et al. (2000), *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 56(Pt 10): 1316-1323, все работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок). Исследование картированием при мутагенезе можно выполнять с использованием любого метода, известного специалисту в данной области техники. См., например, Champe M. et al. (1995), *J. Biol. Chem.*, 270: 1388-1394; и Cunningham BC & Wells JA (1989), *Science*, 244: 1081-1085, обе работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок, на предмет описания методов мутагенеза, включая методы сканирования аланином при мутагенезе. CLIPS (Chemical Linkage of Peptides onto Scaffolds) является технологией для представления одного или нескольких пептидов в структурно ограниченной конфигурации, с поведением функциональных миметиков комплексных белковых доменов. См., например, публикации заявок на патент США № US 2008/0139407 A1 и US 2007/099240 A1, и патент США № 7972993, полностью включенные в настоящее описание в качестве ссылок. В конкретном воплощении эпитоп антитела определяют с использованием исследований мутагенеза сканированием аланином. В конкретном воплощении эпитоп антитела определяют с использованием обмена водород/дейтерий в сочетании с масс-спектрометрией. В конкретном воплощении эпитоп антитела определяют с использованием технологии картирования эпитопов CLIPS Epitope Mapping Technology от Pepscan Therapeutics.

Используемые в настоящем описании термины "Т-клеточный рецептор" и "TCR" используются взаимозаменяемо и относятся к полноразмерным $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$ TCR, антигенсвязывающим фрагментам полноразмерных TCR и молекулам, включающим CDR или вариабельные участки TCR. Примеры TCR включают, но без ограничения, полноразмерные TCR, антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных TCR, растворимые TCR, утрачивающие трансмембранные и цитоплазматические участки, одноцепные TCR, содержащие вариабельные участки TCR, соединенные гибким линкером, цепи TCR, соединенные инженерной дисульфидной связью, моноспецифические TCR, мультиспецифические TCR (включая биспецифические TCR), гибриды TCR, человеческие TCR, гуманизированные TCR, полученные рекомбинантно TCR и синтетические TCR. Термин охватывает TCR дикого типа и TCR, полученные генной инженерией (например, химерные TCR, включающие химерную цепь TCR, которая включает первую часть из TCR первого вида и вторую часть из TCR второго вида).

Используемые в настоящем описании термины "главный комплекс гистосовместимости" и "МНС" используются взаимозаменяемо и относятся к молекуле класса I МНС и/или молекуле класса II МНС.

Используемый в настоящем описании термин "комплекс пептид-МНС" относится к молекуле МНС (МНС класса I или МНС класса II) с пептидом, привязанным в узнаваемом пептидсвязывающем участке МНС.

Используемые в настоящем описании термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к терапевтическим или превентивным мерам, описанным в настоящем описании. В способах "лечения" используется введение антитела субъекту с заболеванием или расстройством или с предположением о наличии такого заболевания или расстройства для предотвращения, излечения, замедления, уменьшения тяжести или ослабления одного или нескольких симптомов заболевания или расстройства или рецидивирующего заболевания или расстройства, или для того, чтобы пролонгировать продолжительность существования субъекта сверх ожидаемого в отсутствие такого лечения.

Используемый в настоящем описании термин "эффективное количество" в контексте назначения терапии субъекту относится к количеству терапии, с которым достигается желательное профилактическое или терапевтическое действие.

Используемый в настоящем описании термин "субъект" включает любого человека или животное, не являющееся человеком. В предпочтительном воплощении субъектом является человек или млекопитающее, не являющееся человеком, предпочтительнее человек.

Определение "процентной идентичности" между двумя последовательностями (например, аминокислотными последовательностями или нуклеотидными последовательностями) можно выполнить с использованием математического алгоритма. Конкретным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin S. & Altschul SF (1990), *PNAS*, 87: 2264-2268, модифицированный в Karlin S. & Altschul SF (1993), *PNAS*, 90: 5873-5877, включенных полностью в настоящее описание в качестве ссылок. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST, Altschul SF et al., (1990), *J. Mol. Biol.*, 215: 403, полностью включена в

настоящее описание в качестве ссылки. Поиск нуклеотидов в BLAST можно выполнить с набором параметров программы нуклеотидов NBLAST, например, для оценки=100, длина слова=12, и получить нуклеотидные последовательности, гомологичные молекулам нуклеиновой кислоты, описанным в настоящем описании. Поиск белков в BLAST можно выполнить с набором параметров программы XBLAST, например, для оценки 50, длина слова=3, и получить аминокислотные последовательности, гомологичные молекулам белков, описанным в настоящем описании. Для того, чтобы получить выравнивания с добавлением гэпов для целей сравнения, можно использовать BLAST с добавлением гэпов, как описано в статье Altschul SF et al. (1997), Nuc. Acids Res., 25: 3389-3402, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки. С другой стороны, можно использовать PSI BLAST для выполнения повторного поиска, который обнаруживает слабые соотношения между молекулами (там же). Когда используют программы BLAST, BLAST с добавлением гэпов и PSI Blast, можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см., например, National Center for Biotechnology Information (NCBI) во всемирной паутине, ncbi.nlm.nih.gov). Другим конкретным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Маерса и Миллера, 1988, CABIOS, 4:11-17, работа полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программ для выравнивания последовательностей GCG. Когда программу ALIGN используют для сравнения аминокислотных последовательностей, можно использовать таблицу взвешенных остатков PAM120, штраф за длину гэта 12 и штраф за гэт 4.

Процентную идентичность между двумя последовательностями можно определить с использованием методов, схожих с методами, описанными выше, с или без учета гэпов. При вычислении процентной идентичности типично посчитывают только точные совпадения.

5.2. Анти-PD-1 антитела

В одном аспекте настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и антагонизируют функцию PD-1. Аминокислотные последовательности примеров антител приводятся в настоящем описании в табл.1-6.

Таблица 1. Последовательности вариабельных участков, CDR и FR примеров анти-PD-1 антител

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
1	AGEN2033w, Кабат CDRH1	SYGMH
2	AGEN2033w, Кабат CDRH2	VIWYDGSNKYYADSVKG
3	AGEN2033w, Кабат CDRH3	NVDY
4	AGEN2033w, Кабат CDRL1	RASQSVSSNLA
5	AGEN2033w, Кабат CDRL2	GASTRAT
6	AGEN2033w, Кабат CDRL3	QQYNNWPRT
7	AGEN2034w, Кабат CDRH3	NGDH
8	AGEN2033w IMGT CDRH1	GFTFSSYG
9	AGEN2033w IMGT CDRH2	IWYDGSNK
10	AGEN2033w IMGT CDRH3	ASNVDY
11	AGEN2033w IMGT CDRL1	QSVSSN
12	AGEN2033w IMGT CDRL2	GAS
13	AGEN2033w IMGT CDRL3	QQYNNWPRT
14	AGEN2034w IMGT CDRH3	ASNGDH
15	AGEN2033w, AGEN2046w VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAWIWYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNVDYWGQ GTLVTVSS

16	AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAW YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISSLQSEDAVYYCQQYNWPRTFGQGTKVE IK
17	AGEN2034w, AGEN2047w VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSS
18	AGEN2033w, тяжелая цепь IgG4 S228P	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPQVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVQLQDWLNKEYKCK VSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLG
52	AGEN2033w, тяжелая цепь IgG4 S228P (без C- концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPQVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVQLQDWLNKEYKCK VSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLG
19	AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w, легкая цепь	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAW YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISSLQSEDAVYYCQQYNWPRTFGQGTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGE

20	AGEN2034w, тяжелая цепь IgG4 S228P	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPQVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
53	AGEN2034w, тяжелая цепь IgG4 S228P (без С- концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPQVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
21	AGEN2046w, тяжелая цепь IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNDVYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPQVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
54	AGEN2046w, тяжелая цепь IgG1 (без С-концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNDVYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPQVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

22	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
55	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 (без С-концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
23	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 N297A	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
56	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 N297A (без С- концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

24	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 S267E/L328F	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAWIYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWSNGALTSVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
57	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 S267E/L328F (без С-концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAWIYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWSNGALTSVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
25	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 S239D/A330L/I332E	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAWIYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWSNGALTSVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
58	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 S239D/A330L/I332E (без С-концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAWIYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWSNGALTSVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

26	AGEN2001w (BADD426-2614)	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAWIYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATNGDYWGQ GTLTVTSS
27	AGEN2002w (BADD426-2615)	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAWIYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDYWGQ GTLTVTSS
28	EP11_p11_B03 (BADD438-2743)		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAWIYDGSNEYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLTVTSS
29	EP11_p11_B05 (BADD438-2745)		QVQLVESGGGMVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAWIYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLTVTSS
30	EP11_p11_C02 (BADD438-2746)		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAWIYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGH GTLTVTSS
31	EP11_p11_C03 (BADD438-2747)		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAWIYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLTVTSS
32	Консенсус CDRH2		VIWX ₁ DGSNX ₂ YYADSVX ₃ G X ₁ является Y или F; X ₂ является K или E; и X ₃ является K или M
33	Консенсус CDRH3		NX ₁ DX ₂ X1 является G или V; и X2 является H или Y
34	CDRH2		VIWYDGSNEYADSVKG
35	CDRH2		VIWFDGSNKYYADSVKG
36	CDRH2		VIWYDGSNKYYADSVMG
37	CDRH3		NGDY
38	VH FR1		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
39	VH FR1		QVQLVESGGGMVQPGRSLRLSCAASGFTFS
40	VH FR2		WVRQAPGKGLEWVA
41	VH FR3		RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS
42	VH FR3		RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT
43	VH FR4		WGQGTLTVTSS
44	VH FR4		WGHGTLTVTSS
45	VL FR1		EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
46	VL FR2		WYQQKPGQAPRLLIY
47	VL FR3		GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
48	VL FR4		FGQGTKVEIK

49	Консенсусная последовательность VH	QVQLVESGGGX ₁ VQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVIWX ₂ DGSNX ₃ YYADSVX ₄ GR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA ₅ NX ₆ D X ₇ WGX ₈ GTLTVSS X ₁ является V или M, X ₂ является Y или F, X ₃ является K или E, X ₄ является K или M, X ₅ является S или T, X ₆ является G или V, X ₇ является H или Y, и X ₈ является Q или H
50	IGHV3-33*01, зародышевая последовательность	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
51	IGKV3-15*01, зародышевая последовательность	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAW YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWP
59	Аллотип G1m3 человеческого IgG1 (без C-концевого лизина)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
60	Аллотип G1m3 человеческого IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
61	IgG1 N297A (без C-концевого лизина)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG

62	IgG1 N297A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKCDK THTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
63	IgG4 S228P (без C-концевого лизина)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNH YTQKSLSLSLG
64	IgG4 S228P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNH YTQKSLSLSLG
65	Константный участок человеческой легкой цепи каппа IGKC*01, аллотип Km3	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS SLTTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC

Таблица 2. Последовательности CDR тяжелых цепей примеров анти-PD-1 антител¹

Антитело	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)
AGEN2033w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NVDY (3)
AGEN2034w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDH (7)
AGEN2001w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDY (37)
AGEN2002w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDY (37)
EP11_p11_B03	SYGMH (1)	VIWYDGSNEYYADSVKG (34)	NGDH (7)
EP11_p11_B05	SYGMH (1)	VIWFDGSNKYYADSVKG (35)	NGDH (7)
EP11_p11_C02	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDH (7)
EP11_p11_C03	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVGM (36)	NGDH (7)

¹CDRs VH в табл.2 определены по Кабат.Таблица 3. Последовательности CDR легких цепей примеров анти-PD-1 антител²

Антитело	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
AGEN2033w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
AGEN2034w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
AGEN2001w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
AGEN2002w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_p11_B03	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_p11_B05	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_p11_C02	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_p11_C03	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)

²CDRs VL в табл.3 определены по Кабат.

Таблица 4. Каркасные (FR) последовательности VH примеров анти-PD-1 антител³

Антитело	VH FR1 (SEQ ID NO:)	VH FR2 (SEQ ID NO:)	VH FR3 (SEQ ID NO:)	VH FR4 (SEQ ID NO:)
AGEN2033 w	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFS (38)	WVRQAPGKGL EWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAS (41)	WGQGTILTV SS (43)
AGEN2034 w	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFS (38)	WVRQAPGKGL EWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAS (41)	WGQGTILTV SS (43)
AGEN2001 w	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFS (38)	WVRQAPGKGL EWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAT (42)	WGQGTILTV SS (43)
AGEN2002 w	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFS (38)	WVRQAPGKGL EWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAS (41)	WGQGTILTV SS (43)
EP11_p11 _B03	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFS (38)	WVRQAPGKGL EWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAS (41)	WGQGTILTV SS (43)
EP11_p11 _B05	QVQLVESGGGMVQPGRS LRLSCAASGFTFS (39)	WVRQAPGKGL EWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAS (41)	WGQGTILTV SS (43)
EP11_p11 _C02	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFS (38)	WVRQAPGKGL EWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAS (41)	WGHGTLTV SS (44)
EP11_p11 _C03	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFS (38)	WVRQAPGKGL EWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAS (41)	WGQGTILTV SS (43)

³Каркасные участки VH, описанные в табл.4, определены на основе границ по системе нумерации по Кабат для CDR. Иными словами, CDR VH определены по Кабат, и каркасные участки представляют собой аминокислотные последовательности, окружающие CDR в вариабельном участке в формате FR1, CDRH1, FR2, CDRH2, FR3, CDRH3 и FR4.

Таблица 5. Каркасные (FR) последовательности VL примеров анти-PD-1 антител⁴

Антитело	VL FR1 (SEQ ID NO:)	VL FR2 (SEQ ID NO:)	VL FR3 (SEQ ID NO:)	VL FR4 (SEQ ID NO:)
AGEN2033 w	EIVMTQSPATLSVSP GERATLSC (45)	WYQQKPGQAPR LLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)
AGEN2034 w	EIVMTQSPATLSVSP GERATLSC (45)	WYQQKPGQAPR LLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)
AGEN2001 w	EIVMTQSPATLSVSP GERATLSC (45)	WYQQKPGQAPR LLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)
AGEN2002 w	EIVMTQSPATLSVSP GERATLSC (45)	WYQQKPGQAPR LLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)
EP11_p11 _B03	EIVMTQSPATLSVSP GERATLSC (45)	WYQQKPGQAPR LLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)
EP11_p11 _B05	EIVMTQSPATLSVSP GERATLSC (45)	WYQQKPGQAPR LLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)
EP11_p11 _C02	EIVMTQSPATLSVSP GERATLSC (45)	WYQQKPGQAPR LLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)
EP11_p11 _C03	EIVMTQSPATLSVSP GERATLSC (45)	WYQQKPGQAPR LLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)

⁴Каркасные участки VL, описанные в табл.5, определены на основе границ по системе нумерации по Кабат для CDR. Иными словами, CDR VL определены по Кабат, и каркасные участки представляют

собой аминокислотные последовательности, окружающие CDR в варибельном участке в формате FR1, CDRL1, FR2, CDRL2, FR3, CDRL3 и FR4.

Таблица 6. Последовательности VH и VL примеров анти-PD-1 антител

Антитело	Варибельный участок тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельный участок легкой цепи	SEQ ID NO:
AGEN2033w	BADD438-2742	15	3738	16
AGEN2034w	BADD438-2744	17	3738	16
AGEN2001w	BADD426-2614	26	3738	16
AGEN2002w	BADD426-2615	27	3738	16
EP11_pl1_B03	BADD438-2743	28	3738	16
EP11_pl1_B05	BADD438-2745	29	3738	16
EP11_pl1_C02	BADD438-2746	30	3738	16
EP11_pl1_C03	BADD438-2747	31	3738	16

Таблица 7. Примеры последовательностей PD-1

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
74	Пример зрелой последовательности PD-1	PGWFLDSPDRPWNPPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSN TSESFVLNWRMSFSPNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFR VTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTLYCGAISLAPKAQI KESLRAELRVTERRAEVPHTAHPSFSPRPAGQFQTLVVG VVGGLLGSLLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLK EDPSAVPVFVSVDYGELDFQWREKTPPEPPVPCVPEQTEY ATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSW PL
75	Эпитоп PD-1 (остатки 107-122)	SLAPKAQIKESLRAEL
76	Эпитоп PD-1 (остатки 5-22)	LDSPDRPWNPPPTFSPALL
77	Эпитоп PD-1 (остатки 6-15)	DSPDRPWNPP
78	Эпитоп PD-1 (остатки 130-138)	EVPTAHPSF
79	Эпитоп PD-1 (остатки 106-113)	ISLAPKAQ

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем

- (a) CDRH1 включает аминокислотную последовательность SYGMH (SEQ ID NO: 1); и/или
(b) CDRH2 включает аминокислотную последовательность VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID NO: 32), в которой

X₁ является Y или F;

X₂ является K или E и

X₃ является K или M и/или

- (c) CDRH3 включает аминокислотную последовательность NX₁X₂ (SEQ ID NO: 33), в которой

X₁ является G или V и

X₂ является H или Y и/или

- (d) CDRL1 включает аминокислотную последовательность RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4); и/или

- (e) CDRL2 включает аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 5); и/или

- (f) CDRL3 включает аминокислотную последовательность QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).

В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VH, описанные выше. В некоторых воплощениях антитело включает CDRH1 одного из антител из табл. 2. В некоторых воплощениях антитело включает CDRH3 одного из антител из табл. 2. В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VH одного из антител из табл. 2 (например, CDR VH из одного ряда в табл. 2, например, все CDR VH из AGEN2033w или AGEN2034w). В некоторых воплощениях антитело включает каркасные участки VH, описанные в настоящем описании. В некоторых воплощениях антитело включает каркасные участки VH антитела, представленные в табл. 4 (например, один, два, три или четыре каркасных участка из одного ряда в табл. 4).

В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VL, описанные выше. В некоторых воплощениях антитело включает CDRL1 одного из антител из табл. 3. В некоторых воплощениях антитело включает CDRL2 одного из антител из табл. 3. В некоторых воплощениях антитело вклю-

часть CDRL3 одного из антител из табл. 3. В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VL одного из антител из табл. 3 (например, CDR VL из одного ряда в табл. 3, например, все CDR VL из AGEN2033w или AGEN2034w). В некоторых воплощениях антитело включает каркасные участки VL, описанные в настоящем описании. В некоторых воплощениях антитело включает каркасные участки (FR) VL антитела, представленные в табл. 5 (например, один, два, три или четыре каркасных участка из одного ряда в табл. 5).

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему вариативный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариативный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем:

- (a) CDRH1 включает аминокислотную последовательность SYGMH (SEQ ID NO: 1);
- (b) CDRH2 включает аминокислотную последовательность VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID NO: 32), в которой
 - X₁ является Y или F;
 - X₂ является K или E и
 - X₃ является K или M;
- (c) CDRH3 включает аминокислотную последовательность NX₁DX₂ (SEQ ID NO: 33), в которой
 - X₁ является G или V и
 - X₂ является H или Y;
- (d) CDRL1 включает аминокислотную последовательность RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4);
- (e) CDRL2 включает аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 5) и
- (f) CDRL3 включает аминокислотную последовательность QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).

В некоторых воплощениях CDRH2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 2 и 34-36. В некоторых воплощениях CDRH3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 3, 7 и 37.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему вариативный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, соответственно представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3; 1, 2 и 7 и 1, 2 и 37; 1, 34 и 7; 1, 35 и 7 или 1, 36 и 7.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему вариативный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариативный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3, соответственно представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6; 1, 2, 7, 4, 5 и 6; 1, 2, 37, 4, 5 и 6; 1, 34, 7, 4, 5 и 6; 1, 35, 7, 4, 5 и 6 или 1, 36, 7, 4, 5 и 6 соответственно.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему:

- (a) CDRH1, включающий аминокислотную последовательность SYGMH (SEQ ID NO: 1) и/или
- (b) CDRH2, включающий аминокислотную последовательность VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2); и/или
- (c) CDRH3, включающий аминокислотную последовательность NVDY (SEQ ID NO: 3) или NGDH (SEQ ID NO: 7); и/или
- (d) CDRL1, включающий аминокислотную последовательность RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4); и/или
- (e) CDRL2, включающий аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 5); и/или
- (f) CDRL3, включающий аминокислотную последовательность QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).

В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VH, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3. В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VH, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 7. В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VL, представленные в SEQ ID NO: 4, 5 и 6.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему вариативный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему вариативный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRH1,

CDRH2 и CDRH3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 7 соответственно.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему вариабельный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3, представленные в SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

В некоторых воплощениях антитело включает вариабельный участок тяжелой цепи, включающий участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельный участок легкой цепи, включающий участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где участки CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6 соответственно.

В некоторых воплощениях антитело включает вариабельный участок тяжелой цепи, включающий участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельный участок легкой цепи, включающий участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где участки CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 7, 4, 5 и 6 соответственно.

В некоторых воплощениях CDR антитела можно определить согласно схеме нумерации Хотиа, относящейся к местоположению структурных петель иммуноглобулина (см., например, Chothia C. & Lesk AM, (1987), J. Mol. Biol., 196: 901-917; Al-Lazikani B. et al. (1997), J. Mol. Biol., 273: 927-948; Chothia C. et al. (1992), J. Mol. Biol., 227: 799-817; Tramontano A. et al. (1990), J. Mol. Biol., 215(1): 175-82; и патент США № 7709226, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок). Типично при использовании системы нумерации по Кабат петля Хотиа CDRH1 присутствует в аминокислотах тяжелой цепи 26-32, 33 или 34, петля Хотиа CDRH2 присутствует в аминокислотах тяжелой цепи 52-56, и петля Хотиа CDRH3 присутствует в аминокислотах тяжелой цепи 95-102, в то время как петля Хотиа CDRL1 присутствует в аминокислотах легкой цепи 24-34, петля Хотиа CDRL2 присутствует в аминокислотах легкой цепи 50-56, и петля Хотиа CDRL3 присутствует в аминокислотах легкой цепи 89-97. Конец петли Хотиа CDRH1 при нумерации с использованием системы нумерации по Кабат, варьирует между H32 и H34, в зависимости от длины петли (это потому, что схема нумерации по Кабат помещает вставки в H35A и H35B; если ни 35A ни 35B не присутствует, петля заканчивается в 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается в 33; если присутствует как 35A, так и 35B, петля заканчивается в 34).

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему CDR VL по Хотиа VL антитела, раскрытого в настоящем описании в табл.6 (например, AGEN2033w или AGEN2034w). В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает CDR VH по Хотиа антитела, раскрытого в настоящем описании в табл.6 (например, AGEN2033w или AGEN2034w). В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает CDR VH по Хотиа и CDR VL по Хотиа антитела, раскрытых в настоящем описании в табл.6 (например, AGEN2033w или AGEN2034w). В некоторых воплощениях антитела, которые специфически связываются с человеческим PD-1, включают один или больше CDR, в которых CDR Хотиа и Кабат имеют одну и ту же аминокислотную последовательность. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и включает комбинации CDR Хотиа и CDR Кабат.

В некоторых воплощениях CDR антитела можно определить согласно системе нумерации IMGT, описанной в Lefranc M-P, (1999), The Immunologist., 7: 132-136, и в Lefranc M-P et al. (1999), Nucleic Acids Res., 27: 209-212, полностью включенных в настоящее описание в качестве ссылок. Согласно системе нумерации IMGT, CDRH1 находится в позициях 26-35, CDRH2 находится в позициях 51-57, CDRH3 находится в позициях 93-102, CDRL1 находится в позициях 27-32, CDRL2 находится в позициях 50-52, и CDRL3 находится в позициях 89-97. В отдельном воплощении настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и включают CDR антитела, раскрытого в настоящем описании в табл. 6 (например, AGEN2033w или AGEN2034w), определенного по системе нумерации IMGT, например, как описано в Lefranc M-P (1999), *цит. выше*, и в Lefranc M-P et al. (1999) *цит. выше*.

В некоторых воплощениях CDR антитела можно определить согласно работе MacCallum RM et al. (1996), J. Mol. Biol., 262: 732-745, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки. См. также, например, труд Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains", в Antibody Engineering, Kontermann and Dubel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001), полностью включенный в настоящее описание в качестве ссылки. В отдельном воплощении настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и включают CDR антитела, раскрытого в настоящем описании в табл. 6 (например, AGEN2033w или AGEN2034w), определенные методом по MacCallum RM et al. (1996), *цит. выше*.

В некоторых воплощениях CDR антитела можно определить согласно системе нумерации AbM, которая относится к гипервариабельным участкам AbM, которая представляет собой компромисс между

CDR по Кабат и структурными петлями по Хотиа, и использована в Оксфордской программе молекулярного моделирования AbM (Oxford Molecular Group, Inc.), полностью включенный в настоящее описание в качестве ссылки. В отдельном воплощении настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и включают CDR антитела, раскрытого в настоящем описании в табл. 6 (например, AGEN2033w или AGEN2034w), определенные по схеме нумерации AbM.

Соответственно, в некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотные последовательности участков CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные в SEQ ID NO: 15, и аминокислотные последовательности участков CDRL1, CDRL2 и CDRL3, представленные в SEQ ID NO: 16, причем каждый CDR определен согласно определению по Кабат, определению по Хотиа, комбинации определения по Кабат и определения по Хотиа, системе нумерации IMGT, определению AbM или контактному определению CDR.

Соответственно в некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотные последовательности участков CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные в SEQ ID NO: 17, и аминокислотные последовательности участков CDRL1, CDRL2 и CDRL3, представленные в SEQ ID NO: 16, причем каждый CDR определен согласно определению по Кабат, определению по Хотиа, комбинации определения по Кабат и определения по Хотиа, системе нумерации IMGT, определению AbM или контактному определению CDR.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем участки CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12 и 13 соответственно.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем участки CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8, 9, 14, 11, 12 и 13 соответственно.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGHV3-33. Один или несколько участков, выбранных из каркаса 1, каркаса 2, каркаса 3, CDRH1 и CDRH2 (например, два, три, четыре или пять таких участков), могут быть получены из человеческой зародышевой последовательности IGHV3-33. В одном воплощении каркас 1, каркас 2, каркас 3, CDRH1 и CDRH2 все получены из человеческой зародышевой последовательности IGHV3-33. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NOs: 15, 17 и 26-31. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17, и вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает вариабельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31, и вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16.

- 29 -

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 15 и 16, соответственно.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 17 и 16, соответственно.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 26 и 16

соответственно.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 27 и 16 соответственно.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 27 и 16 соответственно.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 28 и 16 соответственно.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 28 и 16, соответственно.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 29 и 16 соответственно.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 29 и 16 соответственно.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 30 и 16 соответственно.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 30 и 16 соответственно.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 31 и 16 соответственно.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 31 и 16 соответственно.

Любой константный участок Ig можно использовать в антителах, раскрытых в настоящем описании. В некоторых воплощениях участок Ig является человеческим константным участком тяжелой цепи IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. В некоторых воплощениях участок Ig является человеческим IgG₁. В некоторых воплощениях участок Ig является человеческим IgG₄. В некоторых воплощениях Ig (например, IgG₁) утрачивает N-соединенную гликановую группу, которая обычно присутствует в позиции N297 (согласно нумерации системы EU) в зрелых антителах IgG1 дикого типа *in vivo*. Отсутствие гликана N297 приводит к существенной потере эффекторной функции. Устранения гликана N297 можно достигнуть с использованием любых методов, известных в технике. Например, в некоторых воплощениях устранения гликана N297 достигают мутацией остатка N297 для удаления сайта гликозилирования. Соответственно в некоторых воплощениях антитела, раскрытые в настоящем описании, включают константный участок тяжелой цепи (например, константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁), включающий мутацию N297A согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитела, раскрытые в настоящем описании, включают константный участок тяжелой цепи (например, константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁), включающий мутацию N297Q согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитела, раскрытые в настоящем описании, включают константный участок тяжелой цепи (например, константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁), включающий мутацию D265A согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитела, раскрытые в настоящем описании, включают константный участок тяжелой цепи (например, константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁), включающий мутацию S228P согласно нумерации системы EU.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяже-

лой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62, 63, или 64. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

В некоторых воплощениях участки IgG антител, описанных в настоящем описании, имеют повышенную аффинность в отношении CD32B (также известного как FcγRIIB или FCGR2B), например, по сравнению с антителом с Fc-участком дикого типа, например, IgG1 Fc. В некоторых воплощениях антитела, описанные в настоящем описании, имеют селективно повышенную аффинность в отношении CD32B (FcγRIIB) как по сравнению с CD32A (FcγRIIA), так и CD16 (FcγRIIIA). Изменения последовательности, которые приводят к повышенной аффинности для CD32B, известны в технике, см., например, работы Mimoto et al., *Protein Engineering, Design & Selection*, 10: 589-598 (2013); Chu et al., *Molecular Immunology*, 45: 3926-3933 (2008), и Strohl, *Current Opinion in Biology* 20: 685-691 (2009), которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG1, или его фрагмент, включающий мутацию, выбранную из группы, включающей G236D, P238D, S239D, S267E, L328F и L328E и их комбинации, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG1, или его фрагмент, включающий замены S267E и L328F, нумерованные согласно системе нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например константный участок IgG1, или его фрагмент, включающий замены P238D и L328E, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например константный участок IgG1, или его фрагмент, включающий замену P238D и замены, выбранные из группы, включающей E233D, G237D, H268D, P271G, A330R и их комбинации, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG1, или его фрагмент, включающий замены P238D, E233D, G237D, H268D, P271G и A330R, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG1, или его фрагмент, включающий G236D и S267E, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG1, или его фрагмент, включающий S239D и S267E, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG1, или его фрагмент, включающий V262E, S267E и L328F, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG1, или его фрагмент, включающий V264E, S267E и L328F, нумерованные согласно нумерации системы EU.

В некоторых воплощениях одну, две или больше мутаций (например, замен аминокислот) вводят в Fc-участок антитела, описанного в настоящем описании (например, домен CH2 (остатки 231-340 человеческого IgG1) и/или домен CH3 (остатки 341-447 человеческого IgG1) и/или шарнирный участок, нумерованные согласно нумерации системы EU), для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антигензависимая клеточная токсичность.

В некоторых воплощениях одну, две или больше мутаций (например, аминокислотных замен) вводят в шарнирный участок Fc-участка (домен CH1) так, что изменяется число цистеиновых остатков в шарнирном участке (например, возрастает или снижается), как описано, например, в патенте США № 5677425, полностью включенном в настоящее описание в качестве ссылки. Число цистеиновых остатков

в шарнирном участке может быть изменено для того, чтобы, например, облегчить сборку легкой и тяжелой цепей или изменить (например, повысить или снизить) устойчивость антитела.

В конкретном воплощении одну, две или больше мутаций по аминокислотам (например, аминокислотных замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно шарнирный домен Fc или фрагмент шарнирного домена Fc) для изменения (например, снижения или повышения) времени полужизни антитела *in vivo*. См., например, международные публикации №№ WO 02/060919, WO 98/23289 и WO 97/34631 и патенты США №№ 5869046, 6121022, 6277375 и 6165745, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок, например, на предмет примеров мутаций, которые будут изменять (например, снижать или повышать) время полужизни антитела *in vivo*. В некоторых воплощениях одну, две или больше мутаций по аминокислотам (например, аминокислотных замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно шарнирный домен Fc или фрагмент шарнирного домена Fc) для снижения времени полужизни антитела *in vivo*. В других воплощениях одну, две или больше мутаций по аминокислотам (например, аминокислотных замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно шарнирный домен Fc или фрагмент шарнирного домена Fc) для повышения времени полужизни антитела *in vivo*. В конкретном воплощении антитела могут иметь одну или несколько мутаций по аминокислотам (например, замен) во втором константном (CH2) домене (остатки 231-340 человеческого IgG1) и/или третьем (CH3) домене (остатки 341-447 человеческого IgG1), нумерованы согласно нумерации системы EU. В конкретном воплощении константный участок IgG1 антитела, описанного в настоящем описании, включает замену метионина (M) на тирозин (Y) в позиции 252, замену серина (S) на треонин (T) в позиции 254 и замену треонина (T) на глутаминовую кислоту (E) в позиции 256, при нумерации согласно нумерации системы EU. См. патент США № 7658921, полностью включенный в настоящее описание в качестве ссылки. Показано, что такой тип мутантного IgG, называемого "мутант YTE", отображает время полужизни, возросшее в четыре раза по сравнению с версиями дикого типа того же антитела (см. статью Dall'Acqua WF et al. (2006), J. Biol. Chem., 281: 23514-24, полностью включенную в настоящее описание в качестве ссылки). В некоторых воплощениях антитело включает константный домен IgG, включающий одну, две, три или больше аминокислотных замен аминокислотных остатков в позициях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436, нумерованных согласно нумерации системы EU.

В некоторых воплощениях одну, две или больше мутаций (например, аминокислотных замен) вводят в Fc-участок антитела, описанного в настоящем описании (например, домен CH2 (остатки 231-340 человеческого IgG1) и/или домен CH3 (остатки 341-447 человеческого IgG1) и/или шарнирный участок, нумерованные согласно нумерации системы EU), для повышения или снижения аффинности антитела в отношении Fc-рецептора (например, активированного Fc-рецептора) на поверхности эффекторной клетки. Мутации в Fc-участке антитела, которые снижают или повышают аффинность антитела в отношении Fc-рецептора, и методы введения таких мутаций в Fc-рецептор или его фрагмент известны специалисту в данной области техники. Примеры мутаций Fc-рецептора антитела, которые можно осуществить для изменения аффинности антитела в отношении Fc-рецептора описаны в, например, Smith P. et al. (2012), PNAS, 109: 6181-6186; патенте США № 6737056 и Международных публикациях №№ WO 02/060919, WO 98/23289 и WO 97/34631, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

В другом воплощении одну, две или больше аминокислотных замен вводят в Fc-участок константного домена IgG для изменения функции(й) антитела. Например, одну, две или больше аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, нумерованных согласно нумерации системы EU, можно заменить другим аминокислотным остатком так, что антитело имеет измененную аффинность в отношении эффекторного лиганда, но сохраняет антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменилась, может представлять собой, например, Fc-рецептор или компонент C1 комплемента. Такой подход описан в деталях в патентах США №№ 5624821 и 5648260, которые оба полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. В некоторых воплощениях делеция или инактивация (через точечную мутацию или иными способами) константного домена может ослабить связывание Fc-рецептора циркулирующим антителом, причем посредством этого усиливается локализация опухоли. См., например, патенты США №№ 5585097 и 8591886, каждый из которых полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки, где описаны мутации, которые делетируют или инактивируют константный домен и посредством этого усиливают локализацию опухоли. В некоторых воплощениях одна, две или больше аминокислотных замен могут быть введены в Fc-участок антитела, описанного в настоящем описании, для удаления возможных сайтов гликозилирования в Fc-участке, которые могут ослабить связывание Fc-рецептора (см., например, Shields RL et al. (2001), J. Biol. Chem., 276: 6591-604, полностью включенную в настоящее описание в качестве ссылки). В различных воплощениях в константном участке антитела, описанного в настоящем описании, можно осуществить одну или несколько следующих мутаций: замена N297A; замена N297Q; замена L235A и L237A; замена L234A и L235A; замена E233P; замена L234V; замена L235A; делеция C236; замена P238A; замена D265A; замена A327Q или замена P329A, нумерация согласно нумерации

системы EU. В некоторых воплощениях в константном участке антитела, описанного в настоящем описании, может быть осуществлена мутация, выбранная из группы, включающей D265A, P329A и их комбинацию, при нумерации согласно нумерации системы EU.

В конкретном воплощении антитело, описанное в настоящем описании, включает константный домен IgG1 с аминокислотной заменой N297Q или N297A при нумерации согласно нумерации системы EU. В одном воплощении антитело, описанное в настоящем описании, включает константный домен IgG1 с мутацией, выбранной из группы, включающей D265A, P329A и их комбинацию при нумерации согласно нумерации системы EU. В другом воплощении антитело, описанное в настоящем описании, включает константный домен IgG1 с мутацией, выбранной из группы, включающей L234A, L235A и их комбинацию при нумерации согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях аминокислотные остатки в константном участке антитела, описанного в настоящем описании, в позициях, соответствующих позициям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1, при нумерации согласно нумерации системы EU, не являются L, L и D соответственно. Такой подход описан подробно в международной публикации № WO 14/108483, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. В отдельном воплощении аминокислоты, соответствующие позициям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1, представляют собой F, E и A или A, A и A, соответственно, при нумерации согласно нумерации системы EU.

В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 433 в константном участке антитела, описанного в настоящем описании, при нумерации согласно нумерации системы EU, могут быть заменены другим аминокислотным остатком так, что антитело имеет измененное связывание C1q и/или пониженную или отмененную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Такой подход подробнее описан в патенте США № 6194551 (Idusogie et al.), который полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки. В некоторых воплощениях один или несколько аминокислотных остатков в аминокислотных позициях 231-238 в N-концевом участке домена CH2 антитела, описанного в настоящем описании, изменены для того, чтобы посредством этого изменить способность антитела фиксировать комплемент, при нумерации согласно нумерации системы EU. Такой подход дополнительно описан в международной публикации № WO 94/29351, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. В некоторых воплощениях Fc-участок антитела, описанного в настоящем описании, модифицирован для усиления способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или повышения аффинности антитела в отношении Fcγ-рецептора путем мутирования одной или нескольких аминокислот (например, введения аминокислотных замен) в следующих позициях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439, нумерованных согласно нумерации системы EU. Такой подход дополнительно описан в международной публикации № WO 00/42072, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

В некоторых воплощениях антитело, описанное в настоящем описании, включает константный участок антитела IgG₄, и серин в аминокислотном остатке 228 тяжелой цепи, нумерованный согласно нумерации системы EU, заменен на пролин. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64.

В некоторых воплощениях любую из мутаций или модификаций константного участка, описанных в настоящем описании, можно внести в один или два константных участка антитела, описанного в настоящем описании, имеющего два константных участка тяжелой цепи.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и функционирует как антагонист.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и снижает активность PD-1 по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, при оценке методами, описанными в настоящем описании, и/или известными специалисту в данной области техники, относительно активности PD-1 без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое неспецифически связывается с человеческим PD-1). В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и снижает активность PD-1 по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании, и/или известными специалисту в данной области техники, относительно активности PD-1 без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антите-

лом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1). Неограничивающие примеры активности PD-1 могут включать передачу сигнала PD-1, связывание PD-1 с лигандом PD-1 (например, PD-11 или PD-12), ингибирование продуцирования цитокинов (например, IL-2 или IFN γ) и ингибирование пролиферации Т-клеток. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и дезактивирует, снижает или ингибирует активность PD-1. В конкретных воплощениях активность PD-1 оценивают так, как описано в примерах, см. ниже.

В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и снижает связывание PD-1 с его лигандом (например, PD-11 или PD-12) по меньшей мере примерно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже) или известными специалисту в данной области техники, относительно связывания PD-1 с его лигандом (например, PD-11 или PD-12) без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1). В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и снижает связывание PD-1 с его лигандом (например, PD-11 или PD-12) по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже) или известными специалисту в данной области техники, относительно связывания PD-1 с его лигандом (например, PD-11 или PD-12) без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и повышает продуцирование цитокинов (например, IL-2 или IL-N γ) по меньшей мере примерно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже) или известными специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1). В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и повышает продуцирование цитокинов (например, IL-2 или IFN γ) по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже) или известными специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, и или одно или в комбинации с анти-CTLA-4 антителом (например, ипилимумабом или тремелиумабом), анти-TIGIT антителом, анти-CD137 антителом (например, урелумабом или утомилумабом) или анти-OX40 антителом (например, погализумабом или таволиксизумабом) повышает продуцирование IL-2 в моноклеарных клетках периферической крови человека (PBMC) в ответ на стимуляцию стафилококковым энтеротоксином А (SEA), по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники, относительно продуцирования IL-2 без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

В некоторых воплощениях моноклеарные клетки периферической крови человека (PBMC), стимулированные стафилококковым энтеротоксином А (SEA), в присутствии антитела, описанного в настоящем описании, которое специфически связывается с человеческим PD-1, и или одного или в комбинации с анти-CTLA-4 антителом (например, ипилимумабом или тремелиумабом), анти-TIGIT антителом, анти-CD137 антителом (например, урелумабом или утомилумабом) или анти-OX40 антителом (например, погализумабом или таволиксизумабом), имеют продуцирование IL-2, повышенное примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз относительно PBMC, стимулированных только SEA без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1), при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники.

В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и повышает продуцирование IFN γ совместной культуры

человеческих Т-клеток и аллогенных дендритных клеток по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники, относительно продуцирования IFN γ совместной культуры человеческих Т-клеток и аллогенных дендритных клеток без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

В некоторых воплощениях совместная культура человеческих Т-клеток и аллогенных дендритных клеток в присутствии антитела, описанного в настоящем описании, которое специфически связывается с человеческим PD-1, имеет продуцирование IFN γ , повышенное по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз относительно совместной культуры человеческих Т-клеток и аллогенных дендритных клеток без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1), при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники.

В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и повышает пролиферацию Т-клеток по меньшей мере примерно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники, относительно пролиферации Т-клеток без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1). В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и повышает пролиферацию Т-клеток по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники, относительно пролиферации Т-клеток без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и повышает пролиферацию стимулированных анти-CD3-антителом CD4 $^{+}$ или CD8 $^{+}$ Т-клеток, культивированных совместно с асцитической жидкостью при раке яичников, по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники, относительно пролиферации стимулированных анти-CD3-антителом CD4 $^{+}$ или CD8 $^{+}$ Т-клеток, культивированных совместно с асцитической жидкостью при раке яичников, без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и усиливает передачу сигнала NFAT в PD-1-экспрессирующих NFAT-люциферазы репортерных клетках, культивированных совместно с PD-1-экспрессирующими клетками-мишенями, по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники, относительно передачи сигнала NFAT в PD-1-экспрессирующих NFAT-люциферазы репортерных клетках, культивированных совместно с PD-1-экспрессирующими клетками-мишенями, без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

5.3. Фармацевтические композиции

Настоящее изобретение относится к композициям, включающим анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, имеющее желательную степень чистоты, в физиологически приемлемом носителе, эксципиенте или стабилизаторе (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990), Mack Publishing Co., Easton, PA). Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы в используемых концентрациях являются нетоксичными для реципиентов и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты, антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее примерно 10 остат-

ков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы белков с Zn) и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как Твин™, плюроники™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

В конкретном воплощении фармацевтические композиции включают анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, и необязательно одно или несколько дополнительных профилактических или терапевтических средств в фармацевтически приемлемом носителе. В конкретном воплощении фармацевтические композиции включают эффективное количество антитела, описанного в настоящем описании, и необязательно одно или несколько дополнительных профилактических или терапевтических средств в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых воплощениях только антитело является активным ингредиентом, включенным в фармацевтическую композицию. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, могут применяться при ингибировании активности PD-1 и лечении состояния, такого как рак или инфекционное заболевание. В предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включающей анти-PD-1 антитело по настоящему изобретению, для применения в качестве лекарственного средства. В другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе лечения рака или инфекционного заболевания. В другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к применению анти-PD-1 антитела по настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для лечения рака или инфекционного заболевания.

Фармацевтически приемлемые носители, используемые в парентеральных препаратах, включают водные среды, неводные среды, противомикробные средства, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие вещества, эмульгаторы, секвестрирующие или хелатирующие агенты и другие фармацевтически приемлемые вещества. Примеры водных сред включают растворы для инъекции хлорида натрия, Рингера, изотонические растворы декстрозы, стерильную воду для инъекции, раствор декстрозы и лактированный раствор Рингера для инъекции. Неводные парентеральные среды включают нелетучие масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, сезамовое масло и арахисовое масло. В парентеральные препараты, упакованные в многодозовые контейнеры, в бактериостатических или фунгистатических концентрациях могут добавляться противомикробные средства, которые включают фенолы или крезолы, ртутные препараты, бензиловый спирт, хлорбутанол, метиловый и пропиловый эфиры п-гидроксибензойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Изотонические агенты включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфат и цитрат. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают гидрохлорид прокаина. Суспендирующие и диспергирующие агенты включают карбоксиметилцеллюлозу натрия, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульгаторы включают полисорбат 80 (Твин™ 80). Секвестрирующий или хелатирующий агент ионов металлов включает ЭДТК.

Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для смешивающихся с водой сред и гидроксид натрия, хлороводородную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для регулирования pH.

Фармацевтическую композицию можно составить для любого пути введения субъекту. Конкретные пути введения включают интраназальный, пероральный, легочный, трансдермальный, интрадермальный и парентеральный. Парентеральное введение, описываемое подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекцией, также предполагается в настоящем описании. Препараты для инъекции можно получить в обычных формах в виде жидких растворов или суспензий, твердых формах, подходящих для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, или эмульсиях. Препараты для инъекции, растворы и эмульсии также содержат один или несколько эксципиентов. Подходящими эксципиентами являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза, глицерин или этанол. Кроме того, если желательно, фармацевтические композиции для введения также могут содержать небольшие количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачиватели или эмульгаторы, pH-буферирующие агенты, стабилизаторы, усилители растворимости и другие такие агенты, как например, ацетат натрия, монолаурат сорбитана, олеат триэтаноламина и циклодекстрины.

Препараты для парентерального введения антитела включают стерильные растворы, готовые для инъекции, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные продукты, готовые для соединения с растворителем непосредственно перед применением, включая таблетки для подкожных инъекций, стерильные суспензии, готовые для инъекции, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые для соединения со средой непосредственно перед применением, и стерильные эмульсии. Растворы могут быть или водными или неводными.

Если введение внутривенное, подходящие носители включают физиологический раствор или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS) и растворы, содержащие загустители и солюбилизаторы, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль, и их смеси.

Топические смеси, включающие антитело, получают так, как это описано для местного и системного введения. Полученная смесь может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию или подобное и может быть составлена в виде кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, эликсиров, лосьонов, суспензий, тинктур, паст, пенки, аэрозолей, промываний, спреев, суппозиторий, бандажей, дермальных пэччей или любых других препаратов, подходящих для топического введения.

Анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, можно получить в виде аэрозоля для топического применения, например, ингаляцией (см., например, патенты США №№ 4044120, 4414209 и 4364923, в которых описываются аэрозоли для доставки стероидов, применимых для лечения воспалительных заболеваний, в частности, астмы, и которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок). Такие композиции для введения в дыхательные пути могут находиться в форме аэрозоля или раствора для небулайзера или в виде микротонкого порошка для инсуффляции или в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза. В таком случае частицы композиции будут в одном воплощении иметь диаметр менее 50 мкм, в одном воплощении менее 10 мкм.

Анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, можно получить для местного или топического применения, например, для топического применения к коже и слизистым оболочкам, например, глазам, в форме гелей, кремов и лосьонов, и для применения к глазу или для интракостерального или интраспинального применения. Топическое введение рассматривается для трансдермальной доставки и также для введения в глаза или слизистую оболочку или для ингаляционных терапий. Также можно вводить назальные растворы антитела одного или в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Трансдермальные пэччи, включая устройства для ионофореза и электрофореза, хорошо известны специалистам в данной области техники, и могут использоваться для введения антитела. Например, такие пэччи раскрыты в патентах США №№ 6267983, 6261595, 6256533, 6167301, 6024975, 6010715, 5985317, 5983134, 5948433 и 5,860,957, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция, включающая антитело, описанное в настоящем описании, представляет собой лиофилизированный порошок, который можно восстановить для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Его также можно восстанавливать и получать в виде твердых веществ или гелей. Лيوфилизированный порошок получают путем растворения антитела, описанного в настоящем описании, или его фармацевтически приемлемого производного в подходящем растворителе. В некоторых воплощениях лиофилизированный порошок является стерильным. Растворитель может содержать эксципиент, который улучшает устойчивость, или другой фармакологический компонент порошка или восстановленного раствора, полученного из порошка. Эксципиенты, которые можно использовать, включают, но без ограничения, декстрозу, сорбит, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другой подходящий агент. Растворитель также может содержать буфер, такой как цитрат, фосфат натрия или калия или другой подобный буфер, известный специалистам в данной области техники, в одном воплощении примерно с нейтральным pH. Последующая стерильная фильтрация раствора с последующей лиофилизацией в стандартных условиях, известных специалистам в данной области техники, дает желательную композицию. В одном воплощении полученный раствор будет распределен во флаконы для лиофилизации. Каждый флакон будет содержать одну дозу или несколько доз соединения. Лيوфилизированный порошок можно хранить в соответствующих условиях, таких как примерно от 4°C до комнатной температуры. Восстановление такого лиофилизованного порошка водой для инъекции дает композицию для применения при парентеральном введении. Для восстановления лиофилизированный порошок добавляют к стерильной воде или другому подходящему носителю. Точное количество зависит от выбранного соединения. Такое количество можно определить эмпирически.

Анти-PD-1 антитела, описанные в настоящем описании, и другие композиции, описанные в настоящем описании, также можно получить для направленного воздействия на определенную ткань, рецептор или другую область организма субъекта, которого лечат. Многие такие методы направленного воздействия хорошо известны специалистам в данной области техники. Все такие методы направленного воздействия рассматриваются в настоящем описании для применения в композициях по настоящему изобретению. Как примеры методов направленного воздействия, не являющиеся ограничивающими, см., например, патенты США №№ 6316652, 6274552, 6271359, 6253872, 6139865, 6131570, 6120751, 6071495, 6060082, 6048736, 6039975, 6004534, 5985307, 5972366, 5900252, 5840674, 5759542 и 5,709,874, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. В конкретном воплощении антитело, описанное в настоящем описании, направленно воздействует на опухоль.

Композиции, используемые для введения *in vivo*, могут быть стерильными. Это легко осуществить путем фильтрации через, например, мембраны для стерильной фильтрации.

5.4. Способы применения и применения

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к способу лечения субъекта с использованием

анти-PD-1 антител, раскрытых в настоящем описании. Любое заболевание или расстройство, при которых будет благоприятным ингибирование функции PD-1, можно лечить с использованием анти-PD-1 антител, раскрытых в настоящем описании. Анти-PD-1 антитела, раскрытые в настоящем описании, особенно применимы для ингибирования толерантности иммунной системы к опухолям и соответственно могут использоваться как иммунотерапия для субъекта, больного раком. Например, в некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к способу усиления Т-клеточной активации у субъекта в ответ на антиген, причем способ включает введение субъекту эффективного количества анти-PD-1 антитела или его фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем описании. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к способу лечения рака у субъекта, причем способ включает введение субъекту эффективного количества анти-PD-1 антитела или фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем описании. Раковые заболевания, которые можно лечить анти-PD-1 антителами или фармацевтической композицией, раскрытыми в настоящем описании, включают, без ограничения, меланому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), рак легких (например, немелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак молочной железы (например, устойчивый к герцептину рак молочной железы и устойчивый к трастузумабу-DM1 (T-DM1) рак молочной железы), рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, колоректальный рак, саркому, рак мочевого пузыря, цервикальный рак, HPV-ассоциированные раковые заболевания, раковые заболевания влагалища, раковые заболевания вульвы, раковые заболевания пениса, раковые заболевания ануса, раковые заболевания прямой кишки, раковые заболевания ротоглотки, множественную миелому, почечно-клеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, эндометриальный рак, панкреатический рак, лимфому и лейкоз (например, лейкоз у пожилых, острый миелоидный лейкоз (AML) и AML у пожилых). Следовательно, настоящее изобретение относится в одном воплощении к антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства. В предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к применению антитела и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для получения лекарственного средства для применения в способе лечения рака у субъекта и/или для применения для ингибирования толерантности иммунной системы к опухолям и/или для применения в иммунотерапии для субъекта, имеющего рак, и/или для применения в способе усиления Т-клеточной активации у субъекта в ответ на антиген. В предпочтительном воплощении рак выбирают из группы, включающей меланому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), рак легких (например, немелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак молочной железы (например, устойчивый к герцептину рак молочной железы и устойчивый к трастузумабу-DM1 (T-DM1) рак молочной железы), рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, колоректальный рак, саркому, рак мочевого пузыря, цервикальный рак, HPV-ассоциированные раковые заболевания, раковые заболевания влагалища, раковые заболевания вульвы, раковые заболевания пениса, раковые заболевания ануса, раковые заболевания прямой кишки, раковые заболевания ротоглотки, множественную миелому, почечно-клеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, эндометриальный рак, панкреатический рак, лимфому и лейкоз (например, лейкоз у пожилых, острый миелоидный лейкоз (AML) и AML у пожилых).

Другие раковые заболевания, которые можно лечить анти-PD-1 антителами или фармацевтическими композициями, раскрытыми в настоящем описании, включают, без ограничения, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому и злокачественную меланому кожи или внутриглазную злокачественную меланому), рак почек (например, светлоклеточный рак), рак предстательной железы (например, гормонорефрактерную аденокарциному предстательной железы), рак молочной железы, рак толстой кишки, рак легких (например, немелкоклеточный рак легких), рак костей, панкреатический рак, рак кожи, рак головы и шеи, рак матки, рак яичников, ректальный рак, рак анальной области, рак желудка, тестикулярный рак, рак фаллопиевой трубы, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягкой ткани, рак уретры, рак пениса, хронические или острые лейкозы, включая острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, солидные опухоли у детей, лимфоцитарный лейкоз, рак мочевого пузыря, рак почек или мочеточника, карциному почечных лоханок, неоплазму центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль позвоночника, глиому мозгового ствола, глиому, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, раковые заболевания, вызванные окружающей средой, включая заболевания, вызванные асбестом, эзофагеальный рак, рак печени, рефрактерные или рецидивирующие злокачественности, метастатические раковые заболевания, раковые заболевания, при которых экспрессируется PD-1, и комбинации указанных раковых заболеваний.

В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к способу предупреждения или лечения инфекционного заболевания у субъекта, причем способ включает введение субъекту эффективного количества анти-PD-1 антитела или его фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем описании. Одно воплощение относится к способам предупреждения и/или лечения инфекции (например, вирусной

инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции, протозойной инфекции или паразитарной инфекции). Инфекция, предупреждаемая или подвергающаяся лечению согласно способам, может быть вызвана инфекционным агентом, идентифицированным в настоящем описании. В конкретном воплощении анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его композиция, являются единственными активными агентами, вводимыми субъекту. В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его композицию используют для лечения инфекционных заболеваний в комбинации с противоинфекционными корректирующими средствами (например, противовирусными, антибактериальными, противогрибковыми или антигельминтными). Поэтому в предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к антителу, применению такого антитела для получения фармацевтической композиции и/или фармацевтической композицией по настоящему изобретению для применения в способе предупреждения и/или лечения инфекционного заболевания, причем предпочтительнее антитело или фармацевтическая композиция являются единственными активными агентами, вводимыми субъекту, или антитело или фармацевтическую композицию используют в комбинации с противоинфекционными корректирующими средствами.

Инфекционные заболевания, которые можно лечить и/или предупреждать с помощью анти-PD-1 антител или фармацевтических композиций, раскрытых в настоящем описании, вызываются инфекционными агентами, включающими, но без ограничения, бактерии, паразитов, грибы, простейших и вирусы. В конкретном воплощении инфекционное заболевание, которое лечат и/или предупреждают с помощью анти-PD-1 антител или фармацевтических композиций, раскрытых в настоящем описании, вызывается вирусом. Вирусные заболевания или вирусные инфекции, которые можно предупреждать и/или лечить согласно способам, описанным в настоящем описании, включают, но без ограничения, заболевания, вызванные вирусом гепатита типа А, гепатита типа В, гепатита типа С, гриппа (например, гриппа А или гриппа В), ветряной оспы, аденовирусом, вирусом простого герпеса типа I (HSV-I), вирусом простого герпеса типа II (HSV-II), чумы рогатого скота, риновирусом, эховирусом, ротавирусом, респираторно-сенцитиальным вирусом, вирусом папилломы, паповавирусом, цитомегаловирусом, Echinovirus, арбовирусом, хантавирусом, вирусом Коксаки, свинки, кори, коревой краснухи, полиомиелита, натуральной оспы, вирусом Эпштейна-Барра, вирусом иммунодефицита человека типа I (ВИЧ-I), вирусом иммунодефицита человека типа II (ВИЧ-II), и агентами вирусных заболеваний, таких как вирусный менингит, энцефалит, денге или натуральная оспа.

Бактериальные инфекции, которые можно предупреждать и/или лечить, включают инфекции, вызванные *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* и *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериальные заболевания, вызванные бактериями (например, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridians* и *Pseudomonas aeruginosa*), которые можно предупреждать и/или лечить согласно способам, описанным в настоящем описании, включают, но без ограничения, микобактериальный риккетсиоз, микоплазмоз, нейссерииоз, пневмонию, болезнь, вызванную *Borrelia burgdorferi* (болезнь Лайма), болезнь, вызванную *Bacillus anthracis* (сибирская язва), столбняк, болезнь, вызванную *Streptococcus*, *Staphylococcus*, микобактериями, коклюш, холеру, чуму, дифтерию, хламидиоз, болезнь, вызванную *S. aureus*, и болезнь легионеров.

Протозойные заболевания или протозойные инфекции, вызванные простейшими, которые можно предупреждать и/или лечить способами, описанными в настоящем описании, включают, но без ограничения, лейшманиоз, кокцидиоз, трипаносомоз, шистосомоз или малярию. Паразитарные заболевания или паразитарные инфекции, которые можно предупреждать и/или лечить согласно способам, описанным в настоящем описании, включают, но без ограничения, хламидиоз и риккетсиоз.

Грибковые заболевания или грибковые инфекции, которые можно предупреждать и/или лечить способами, описанными в настоящем описании, включают, но без ограничения, заболевания, вызванные *Candida infections*, зигомикоз, *Candida* мастит, прогрессирующий диссеминированный трихоспороноз с латентной трихоспорономией, диссеминированный кандидоз, паракокцидиоидомикоз легких, аспергиллез легких, пневмонию, вызванную *Pneumocystis carinii*, криптококковый менингит, кокцидиодный менингоэнцефалит и цереброспинальный васкулит, инфекцию *Aspergillus niger*, *Fusarium keratitis*, микозы параназальных синусов, эндокардит, вызванный *Aspergillus fumigatus*, дисхондроплазию большеберцовой кости, вагинит, вызванный *Candida glabrata*, орофарингеальный кандидоз, X-сцепленную хроническую гранулематозную болезнь, эпидермофитию стоп, кандидоз кожи, микотический плацентит, диссеминированный трихоспороноз, аллергический бронхолегочный аспергиллез, микотический кератит, инфекцию *Cryptococcus neoformans*, грибковый перитонит, инфекцию *Curvularia geniculata*, стафилококковый эндофтальмит, споротрихоз и дерматофитию.

В некоторых воплощениях такие способы также включают введение субъекту дополнительного терапевтического средства. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство является химиотерапевтическим, радиотерапевтическим или средством, направленно воздействующее на контрольную точку. В некоторых воплощениях средство, направленно воздействующее на контрольную точку, выбирают из группы, включающей антагонистическое анти-CTLA-4 антитело, антагонистическое анти-PD-1 антитело, антагонистическое анти-PD-2 антитело, антагонистическое анти-PD-1 антитело, антаго-

нистическое анти-TIM-3 антитело, антагонистическое анти-LAG-3 антитело, антагонистическое анти-CEACAM-1 антитело, антагонистическое анти-TIGIT антитело, агонистическое анти-CD137 антитело, агонистическое анти-ICOS антитело, агонистическое анти-GITR антитело и агонистическое анти-OX40 антитело. В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с антагонистическим анти-CTLA-4 антителом и агонистическим анти-ICOS антителом. В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с антагонистическим анти-CTLA-4 антителом. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к способу лечения рака у субъекта, причем способ включает введение субъекту анти-PD-1 антитела или его фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем описании, в комбинации с антагонистическим анти-CTLA-4 антителом или его фармацевтической композицией, причем рак выбирают из группы, включающей рак легких (например, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), например, NSCLC первой линии), меланому (например, меланому первой линии) и рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи (SCCHN), например, SCCHN первой линии).

В предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к антителу, применению такого антитела для получения фармацевтических композиций, и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе по настоящему изобретению, причем способ также включает введение субъекту дополнительного терапевтического средства. В другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к (а) антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству для применения в качестве лекарственного средства. В другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к (а) антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству для применения в способе лечения рака. В другом воплощении настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или комплексу частей, включающему (а) антитело и/или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и (b) дополнительное терапевтическое средство. В одном более предпочтительном воплощении дополнительное терапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое, радиотерапевтическое или средство, направленно воздействующее на контрольную точку.

В некоторых воплощениях анти-CTLA-4 антитело используют в способах, раскрытых в настоящем описании. В некоторых воплощениях анти-CTLA-4 антитело представляет собой ипилимумаб, разработанный Bristol-Myers Squibb. В некоторых воплощениях анти-CTLA-4 антитело представляет собой тремелимуаб, разработанный Pfizer и Medimmune. В некоторых воплощениях анти-CTLA-4 антитело представляет собой Probody, направленно воздействующее на CTLA-4, разработанное CytomX и Bristol-Myers Squibb.

Примеры анти-CTLA-4 антител, которые можно использовать в способах лечения, раскрытых в настоящем описании, раскрываются, без ограничения, в следующих патентах и заявках на патент, которые все полностью включены в настоящее описание: патент США № 6984720; патент США № 7411057; патент США № 7034121; патент США № 8697845; патент США № 8518404; публикация заявки на патент США № US 2009/0123477 A1; публикация заявки на патент США № US 2014/0105914 A1; публикация заявки на патент США № US 2013/0267688 A1; публикация заявки на патент США № US 2016/0145355 A1; публикация PCT № WO 2014/207064 A1 и публикация PCT № WO 2016/015675 A1.

В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с соединением, которое направленно воздействует на иммуномодулирующий(ие) фермент(ы), такие как IDO (индоламин-(2,3)-диоксигеназа) и/или TDO (триптофан-2,3-диоксигеназа). Следовательно, в другом более предпочтительном воплощении дополнительным терапевтическим средством является соединение, которое направленно воздействует иммуномодулирующий(ие) фермент(ы), даже предпочтительнее, ингибитор индоламин-(2,3)-диоксигеназы (IDO). В некоторых воплощениях такое соединение выбирают из группы, включающей эпикадостат (Incyte Corp; см., например, WO 2010/005958, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки), F001287 (Flexus Biosciences/Bristol-Myers Squibb), индоксимод (NewLink Genetics) и NLG919 (NewLink Genetics). В одном воплощении соединение представляет собой эпикадостат. В другом воплощении соединение представляет собой F001287. В другом воплощении соединение представляет собой индоксимод. В другом воплощении соединение представляет собой NLG919.

В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с вакциной. Вакцина может представлять собой, например, пептидную вакцину, ДНК-вакцину или РНК-вакцину. В некоторых воплощениях вакцина является противоопухолевой вакциной на основе белков теплового шока или вакциной против патогенов на основе белков теплового шока. В конкретном воплощении анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с противоопухолевой вакциной на основе белков теплового шока. Белки теплового шока (HSP) являются семейством высоко консервативных белков, обнаруженных повсеместно во всех видах. Их экспрессия может быть индуцирована в сильной степени до более высоких уровней в результате теплового шока или других форм стресса, включая воздействие токсинов, окислительный стресс или глюкозную депривацию. По молекулярной массе классифицировано пять семейств: HSP-110, -90, -70, -60 и -28. HSP

доставляют иммуногенные пептиды по пути кросс-презентации в антигенпредставляющие клетки (APC), такие как макрофаги и дендритные клетки (DC), приводя к Т-клеточной активации. HSP функционируют как носители шаперонов опухольассоциированных антигенных пептидов, образующих комплексы, способные индуцировать опухольспецифический иммунитет. После высвобождения из погибающих опухолевых клеток комплексы HSP-антиген процессируются в пептиды, которые связывают молекулы MHC класса I и класса II, что ведет к активации противоопухолевых CD8+ и CD4+ Т-клеток. Иммунитет, выявленный комплексами HSP, полученными из опухолевых препаратов, специфически направлен против уникального репертуара антигенных пептидов, экспрессированных при раке у каждого субъекта. Следовательно, в другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к (а) антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) вакцине для применения в качестве лекарственного средства, в частности, для применения в способе лечения рака. В другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или комплексу частей, включающим (а) антитело и/или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и (b) вакцину. В другом предпочтительном воплощении вакцина является противоопухолевой вакциной на основе белков теплового шока или вакциной против патогенов на основе белков теплового шока, предпочтительнее противоопухолевой вакциной на основе белков теплового шока.

Комплекс белков теплового шока с пептидами (HSPPC) представляет собой белково-пептидный комплекс, состоящий из белка теплового шока в нековалентном комплексе с антигенными пептидами. HSPPC выявляет как врожденные, так и приобретенные иммунные реакции. В конкретном воплощении антигенный(е) пептид(ы) отображает(ют) антигенность для рака, от которого лечат. HSPPC эффективно захватываются APC через мембранные рецепторы (главным образом CD91) или путем связывания с толл-подобными рецепторами. Интернализация HSPPC приводит к функциональному созреванию APC с продуцированием хемокинов и цитокинов, ведущим к активации природных клеток-киллеров (NK), моноцитов и Th-1- и Th-2-опосредованным иммунным реакциям. В некоторых воплощениях HSPPC, используемые в способах, раскрытых в настоящем описании, включают один или несколько белков теплового шока из семейства hsp60, hsp70 или hsp90 стрессовых белков в комплексе с антигенными пептидами. В некоторых воплощениях HSPPC включают hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, grp96, кальретикулин или комбинации двух или большего их числа.

В конкретном воплощении комплекс белков теплового шока с пептидами (HSPPC) включает рекомбинантные белки теплового шока (например, hsp70 или hsc70) или их пептидсвязывающие домены в комплексе с рекомбинантными антигенными пептидами. Рекомбинантные белки теплового шока можно получить технологией рекомбинантных ДНК, например, с использованием последовательности hsc70, как описано в Dworniczak and Mirault, *Nucleic Acids Res.*, 15: 5181-5197 (1987), и GenBank, инвентарный номер P11142 и/или Y00371, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. В некоторых воплощениях последовательности Hsp70 такие, как описанные в работах Hunt and Morimoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82 (19), 6455-6459 (1985) и GenBank, инвентарный номер P0DMV8 и/или M11717, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. Антигенные пептиды также можно получить методами рекомбинантных ДНК, известными в технике.

В некоторых воплощениях антигенные пептиды включают модифицированную аминокислоту. В некоторых воплощениях модифицированная аминокислота включает посттрансляционную модификацию. В некоторых воплощениях модифицированная аминокислота включает имитацию посттрансляционной модификации. В некоторых воплощениях модифицированная аминокислота представляет собой Tyr, Ser, Thr, Arg, Lys или His, которая фосфорилирована по гидроксилу или амину боковой цепи. В некоторых воплощениях модифицированная аминокислота представляет собой миметик аминокислоты Tyr, Ser, Thr, Arg, Lys или His, которая фосфорилирована по гидроксилу или амину боковой цепи.

В конкретном воплощении анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с комплексом белков теплового шока с пептидами (HSPPC), например, комплексом белков теплового шока с пептидами 96 (HSPPC-96), для лечения рака. HSPPC-96 включает белок теплового шока в 96 кДа (Hsp), grp96, в комплексе с антигенными пептидами. HSPPC-96 является средством противораковой иммунотерапии, полученным из опухоли субъекта, и содержит антигенный "отпечаток" рака. В некоторых воплощениях такой отпечаток содержит уникальные антигены, которые присутствуют только в конкретных раковых клетках определенного субъекта, и предполагается, что инъекция вакцины стимулирует иммунную систему субъекта для узнавания и атаки любых клеток со специфическим раковым отпечатком. Следовательно, в еще одном предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению в комбинации с комплексом белков теплового шока с пептидами (HSPPC) для применения в качестве лекарственного средства и/или для применения в способе лечения рака.

В некоторых воплощениях HSPPC, например, HSPPC-96, получают из опухолевой ткани субъекта. В конкретном воплощении HSPPC (например, HSPPC-96) получают из опухоли типа рака, от которого лечат, или его метастаз. В другом конкретном воплощении HSPPC (например, HSPPC-96) является аутологичным для субъекта, которого лечат. В некоторых воплощениях опухолевая ткань является некротической опухолевой тканью. В некоторых воплощениях по меньшей мере 1 г (например, по мень-

шей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 г) некротической опухолевой ткани используют для получения режима вакцины. В некоторых воплощениях после хирургической резекции не-некротическую опухолевую ткань замораживают перед применением при получении вакцины. В некоторых воплощениях HSPPC, например, HSPPC-96, выделяют из опухолевой ткани методами очистки, фильтруют и готовят для вакцины для инъекции. В некоторых воплощениях субъекту вводят 6-12 доз HSPPC, например, HSPPC-96. В таких воплощениях дозы HSPPC, например, HSPPC-96, могут вводиться еженедельно в случае первых 4 доз и затем раз в две недели в случае дополнительных 2-8 доз.

Другие примеры HSPPC, которые можно использовать согласно способам, описанным в настоящем описании, раскрываются в следующих патентах и заявках на патент: патенты США №№ 6391306, 6383492, 6403095, 6410026, 6436404, 6447780, 6447781 и 6610659, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с адьювантом. Можно использовать различные адьюванты в зависимости от контекста лечения. Неограничивающие примеры соответствующих адьювантов включают, но без ограничения, полный адьювант Фрейнда (CFA), неполный адьювант Фрейнда (IFA), монтанид ISA (неполный адьювант от Seppic), адьювантную систему Ribi (RAS), Titer Max, мурамилпептиды, адьювантный препарат Syntex (SAF), алюм (гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия), адьюванты соли алюминия, адьюванты Gerbu®, антиген, абсорбированный нитроцеллюлозой, инкасулированный или захваченный антиген, 3-де-О-ацилированный монофосфорилилипид A (3 D-MPL), иммуностимулирующие олигонуклеотиды, лиганды толл-подобных рецепторов (TLR), лиганды маннансвязывающего лектина (MBL), агонисты STING, иммуностимулирующие комплексы, такие как сапонины, Quil A, QS-21, QS-7, ISCOMATRIX и другие. Другие адьюванты включают CpG-олигонуклеотиды и молекулы двухцепочечной РНК, такие как поли(А) и поли(У). Также можно использовать комбинации вышеуказанных адьювантов. См., например, патенты США №№ 6645495, 7029678 и 7858589, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. В одном воплощении адьювантом, используемым в настоящем изобретении, является QS-21 STIMULON.

В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, включающим TCR. В некоторых воплощениях дополнительным терапевтическим средством является растворимый TCR. В некоторых воплощениях дополнительным терапевтическим средством является клетка, экспрессирующая TCR. Следовательно, в еще одном предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, включающим TCR, для применения в качестве лекарственного средства и/или для применения в способе лечения рака.

В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с клеткой, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых воплощениях клетка является Т-клеткой.

В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с имитирующим TCR антителом. В некоторых воплощениях имитирующим TCR антителом является антитело, которое специфически связывается с комплексом пептид-МНС. Примеры имитирующих TCR антител, но без ограничения, см., например, в патенте США № 9074000 и публикациях заявок на патент США №№ US 2009/0304679 A1 и US 2014/0134191 A1, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Анти-PD-1 антитело и дополнительное терапевтическое средство (например, химиотерапевтическое, радиотерапевтическое, средство, направленно воздействующее на контрольную точку, ингибитор IDO, вакцину, растворимый TCR, клетку, экспрессирующую TCR, клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор, и/или имитирующее TCR антитело) можно вводить отдельно, последовательно или одновременно в виде отдельных лекарственных форм. В одном воплощении анти-PD-1 антитело вводят парентерально, и ингибитор IDO вводят перорально.

Антитело или фармацевтическую композицию, описанные в настоящем описании, можно доставить субъекту различными путями. Они включают, без ограничения, парентеральный, интраназальный, интратекальный, пероральный, интрадермальный, конъюнктивальный, интраартериальный и подкожный пути. Также можно использовать легочное введение, например, с использованием ингалятора или небулайзера, и препарата с образующим аэрозоль агентом для применения в виде спрея. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию, описанные в настоящем описании, доставляют подкожно или внутривенно. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию, описанные в настоящем описании, доставляют интраартериально. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию, описанные в настоящем описании, доставляют интратуморально. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию, описанные в настоящем описании, доставляют в лимфоузел, дренирующий опухоль.

Количество антитела или композиции, которое будет эффективным при лечении и/или предупреждении состояния, будет зависеть от характера заболевания и может быть определено обычными клиническими методами.

Точная доза, используемая в композиции, также будет зависеть от пути введения и тяжести инфекции или заболевания, вызванного ею, и должна определяться согласно представлению лечащего врача и особенностей каждого субъекта. Например, эффективные дозы также могут изменяться в зависимости от способов введения, места-мишени, физиологического состояния пациента (включая возраст, массу тела и состояние здоровья), является ли пациент человеком или животным, других вводимых лекарств, или является лечение профилактическим или терапевтическим. Как правило, пациентом является человек, но также можно лечить млекопитающих, не являющихся людьми, включая трансгенных млекопитающих. Лечебные дозировки оптимально титруют для оптимизации безопасности и эффективности.

Анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, также можно использовать для анализа уровней белка PD-1 в биологическом образце с использованием классических иммуногистологических методов, известных специалистам в данной области техники, включая иммуноанализы, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммунопреципитация или вестерн-блоттинг. Подходящие метки для анализов с антителами известны в технике и включают ферментные метки, такие как глюкозооксидаза, радиоизотопы, такие как йод (^{125}I , ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{121}In) и технеций (^{99}Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, и биотин. Такие метки можно использовать для мечения антитела, описанного в настоящем описании. С другой стороны, можно пометить второе антитело, которое узнает анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, и использовать в комбинации с анти-PD-1 антителом для детекции уровней белка PD-1. Следовательно, в одном воплощении настоящее изобретение относится к применению антитела по настоящему изобретению для детекции *in vitro* белка человеческого PD-1 в биологическом образце. В другом воплощении настоящее изобретение относится к применению анти-PD-1 антитела по настоящему изобретению для анализа и/или детекции уровней белка человеческого PD-1 в биологическом анализе *in vitro*, причем предпочтительно анти-PD-1 антитело конъюгировано с радионуклеидом или детектируемой меткой и/или содержит метку, описанную в настоящем описании, и/или при этом используют иммуногистологический метод.

Предполагается, что анализ уровня экспрессии белка PD-1 включает качественное или количественное измерение или оценку уровня белка PD-1 в первом биологическом образце непосредственно (например, путем определения или оценки абсолютного уровня белка) или относительно (например, путем сравнения с уровнем белка, ассоциированного с заболеванием, во втором биологическом образце). Уровень экспрессии полипептида PD-1 в первом биологическом образце можно измерить или оценить и сравнить со стандартным уровнем белка PD-1, причем стандартный уровень берут из второго биологического образца, полученного от индивидуума, не имеющего расстройства, или определяют путем усреднения уровня у популяции индивидуумов, не имеющих расстройства. Как будет принято в технике, так как "стандартный" уровень полипептида PD-1 известен, его можно использовать повторно как стандарт для сравнения. Следовательно, в другом воплощении настоящее изобретение относится к *in vitro* способу анализа и/или детекции уровней белка PD-1, в частности, уровней человеческого белка PD-1, в биологическом образце, включающему качественное или количественное измерение или оценку уровня белка PD-1, в частности, человеческого белка PD-1, в биологическом образце иммуногистологическим методом.

Используемый в настоящем описании термин "биологический образец" относится к любому биологическому образцу, полученному от субъекта, клеточной линии, ткани или другого источника клеток, потенциально экспрессирующих PD-1. Методы получения биопсий тканей и жидкостей организма от животных (например, людей) хорошо известны в технике. Биологические образцы включают периферические моноклеарные клетки крови.

Анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, можно использовать для применений при прогнозировании, диагностике, мониторинге и скрининге, включая применения *in vitro* и *in vivo*, хорошо известные и стандартные для специалистов в данной области техники, и основанные на настоящем описании. Прогностические, диагностические, контролирующие и скринирующие анализы и наборы для суждения *in vitro* и оценки статуса иммунной системы и/или иммунной реакции можно использовать для предсказания, диагностики и мониторинга для оценки образцов пациента, включая пациентов, известных как имеющих или с предположением о наличии дисфункции иммунной системы, или в отношении ожидаемой или желательной реакции иммунной системы, реакции на антиген или реакции на вакцину. Суждение и оценка статуса иммунной системы и/или иммунной реакции также применимы при определении соответствия пациента для клинического испытания лекарственного средства или для введения определенного химиотерапевтического средства, радиотерапевтического средства или антитела, включая их комбинации, против другого средства или антитела. Такой тип прогностического и диагностического мониторинга и оценки уже имеется в практике с использованием антител против белка HER2 при раке молочной железы (HerceptestTM, Dako), где анализ также используют для оценки пациентов для терапии

антителами с использованием герцептина®. Применения *in vivo* включают направленную клеточную терапию и модуляцию иммунной системы и радиоизображение иммунных реакций. Следовательно, в одном воплощении настоящее изобретение относится к анти-PD-1 антителу, применению такого антитела для получения фармацевтической композиции и/или фармацевтическим композициям по настоящему изобретению для применения в качестве диагностического средства. В предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к анти-PD-1 антителу, применению такого антитела для получения фармацевтической композиции и/или фармацевтическим композициям по настоящему изобретению для применения в способе предсказания, диагностики и/или мониторинга субъекта, имеющего или предположительно имеющего дисфункцию иммунной системы, и/или в отношении ожидаемой или желательной реакции иммунной системы, реакции на антиген или реакции на вакцину. В другом воплощении настоящее изобретение относится к применению анти-PD-1 антитела по изобретению для предсказания, диагностики и/или мониторинга субъекта, имеющего или предположительно имеющего дисфункцию иммунной системы, и/или в отношении ожидаемой или желательной реакции иммунной системы, реакции на антиген или реакции на вакцину, путем анализа и/или детекции *in vitro* уровней человеческого белка PD-1 в биологическом образце субъекта.

В одном воплощении анти-PD-1 антитело можно использовать при иммуногистохимии образцов биопсии.

Предпочтительно способ является методом *in vitro*. В другом воплощении анти-PD-1 антитело можно использовать для детекции уровней PD-1 или уровней клеток, которые содержат PD-1 на поверхности своих мембран, и затем такие уровни можно связать с симптомами некоторых заболеваний. Анти-PD-1 антитела, описанные в настоящем описании, могут содержать детектируемую или функциональную метку и/или могут быть конъюгированы с радионуклидом или детектируемой меткой. Когда используют флуоресцентные метки, можно использовать доступные в настоящее время микроскопию и анализ с помощью флуоресцентно-активированного клеточного сортера (FACS) или комбинацию процедур обоих методов, известных в технике, для идентификации и количественного определения участников специфического связывания. Анти-PD-1 антитела, описанные в настоящем описании, могут содержать или могут быть конъюгированы с флуоресцентной меткой. Примеры флуоресцентных меток включают, например, реакционноспособные и конъюгированные зонды, например, аминокумарин, флуоресцеин и красители техасский красный, Alexa Fluor, красители Cy и DyLight. Анти-PD-1 антитела могут содержать или могут быть конъюгированы с радиоактивной меткой или радионуклидом, такими как изотопы ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{198}Au , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac и ^{186}Re . Когда используют радиоактивные метки, можно использовать доступные в настоящее время процедуры подсчета, известные в технике, для идентификации и количественного определения специфического связывания анти-PD-1 антитела с PD-1 (например, человеческим PD-1). В случае, когда меткой является фермент, детекцию можно выполнить любыми используемыми в настоящее время колориметрическими, спектрофотометрическими, флуороспектрофотометрическими, амперометрическими или газометрическими методами, известными в технике. Этого можно достигнуть введением в контакт образца или контрольного образца с анти-PD-1 антителом в условиях, которые допускают образование комплекса между антителом и PD-1. Любые комплексы, образованные между антителом и PD-1, детектируют в образце и в контроле и сравнивают. В свете специфического связывания антител для PD-1, описанных в настоящем описании, антитела можно использовать специфически для детекции экспрессии PD-1 на поверхности клеток. Антитела, описанные в настоящем описании, также можно использовать для очистки PD-1 путем иммуоаффинной очистки. В настоящее описание также включается система анализа, которую можно получить в форме набора для анализа, набора или комплекта частей для количественного анализа предела присутствия, например, для PD-1 или комплексов PD-1/лиганд PD-1. Система, набор для анализа, набор или комплект частей могут включать меченный компонент, например, меченное антитело, и один или несколько дополнительных иммунохимических реагентов.

5.5. Полинуклеотиды, векторы и способы получения анти-PD-1 антител

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, включающим нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент (например, вариабельный участок легкой цепи и/или вариабельный участок тяжелой цепи), которые специфически связываются с антигеном PD-1 (например, человеческим PD-1), и векторам, например, векторам, включающим такие полинуклеотиды для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (например, клетках *E. coli* и млекопитающих). Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, включающим нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую и/или легкую цепь любого из антител по настоящему изобретению, а также векторам, включающим такие нуклеотидные последовательности, например, экспрессирующим векторам, для их эффективной экспрессии в клетках-хозяевах, например, клетках млекопитающих.

При использовании в настоящем описании "изолированный" полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты является молекулой, которая отделена от других молекул нуклеиновой кислоты, которые присутствуют в природном источнике (например, в организме мыши или человека) молекул нуклеиновой кислоты. Кроме того, "изолированная" молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула ДНК, может

быть по существу свободна от другого клеточного материала или культуральной среды, когда получена рекомбинантными методами, или по существу свободна от химических предшественников или других химических соединений, когда синтезирована химически. Например, выражение "по существу свободный" включает препараты полинуклеотида или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющие менее примерно 15%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (в частности, менее примерно 10%) другого материала, например, клеточного материала, культуральной среды, других молекул нуклеиновой кислоты, химических предшественников и/или других химических соединений. В конкретном воплощении молекула(ы) нуклеиновой кислоты, кодирующая(ие) антитело, описанное в настоящем описании, является(ются) изолированной(ыми) или очищенной(ыми).

В отдельных аспектах настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, включающим нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, которые специфически связываются с полипептидом PD-1 (например, человеческим PD-1) и включают аминокислотную последовательность, описанную в настоящем описании, а также антитела, которые конкурируют с такими антителами за связывание с полипептидом PD-1 (например, в зависимости от дозы), или которые связываются с тем же эпитопом, что и такие антитела.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, включающим нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или тяжелую цепь антитела, описанного в настоящем описании. Полинуклеотиды могут включать нуклеотидные последовательности, кодирующие легкую цепь, включающую FR и CDR VL антител, описанных в настоящем описании (см., например, табл.3 и 5), или нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь, включающую FR и CDR VH антител, описанных в настоящем описании (см., например, табл.2 и 4).

Настоящее изобретение также относится к анти-PD-1 антителам, которые оптимизированы, например, путем оптимизации кодон/ПНК, замены гетерологичными сигнальными последовательностями и элиминации элементов неустойчивости мПНК. Способы получения оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих анти-PD-1 антитело или его фрагмент (например, легкую цепь, тяжелую цепь, домен VH, домен VL), для рекомбинантной экспрессии путем включения изменений кодона и/или элиминации ингибирующих участков в мПНК, можно осуществить путем адаптации способов, описанных в, например, патентах США №№ 5965726, 6174666, 6291664, 6414132 и 6794498, соответственно, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Например, потенциальные сайты сплайсинга и элементы неустойчивости (например, обогащенные A/T или A/U элементы) в ПНК могут быть мутированы без изменения аминокислот, кодированных нуклеотидными последовательностями, для усиления устойчивости ПНК для рекомбинантной экспрессии. Изменения используют вырождение генетического кода, например, с использованием альтернативного кодона для идентичной аминокислоты. В некоторых воплощениях может быть желательно изменение одного или нескольких кодонов для кодирования консервативной мутации, например, схожей аминокислоты со схожей химической структурой и свойствами и/или функцией как у исходной аминокислоты. Такие способы могут повысить экспрессию анти-PD-1 антитела или его фрагмента по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз или больше относительно экспрессии анти-PD-1 антитела, кодированного полинуклеотидами, которые не оптимизированы.

В некоторых воплощениях оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент (например, домен VL и/или домен VH), может гибридизировать с антисмысловым (например, комплементарным) полинуклеотидом неоптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент (например, домен VL и/или домен VH). В конкретных воплощениях оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент, гибридизует в условиях высокой строгости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент. В конкретном воплощении оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, гибридизует в условиях гибридизации высокой строгости, промежуточной или более низкой строгости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент. Информация, касающаяся условий гибридизации, имеется, см., например, публикацию заявки на патент США № US 2005/0048549 (например, абзацы 72-73), включенную полностью в настоящее описание в качестве ссылки.

Полинуклеотиды можно получить и определить нуклеотидную последовательность полинуклеотидов любым методом, известным в технике. Нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, описанные в настоящем описании, например, антитела, описанные в табл. 1-6, и модифицированные версии таких антител, можно определить с использованием методов, известных в технике, т.е., кодоны нуклеотидов, известные как кодирующие определенные аминокислоты, собирают таким образом, что получают нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело. Такой полинуклеотид, кодирующий антитело,

можно собрать из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, как описано в Kutmeier G. et al. (1994), *BioTechniques*, 17: 242-6, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки), когда, коротко, вовлекается синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей антитело, отжиг и лигирование таких олигонуклеотидов и последующая амплификация лигированных олигонуклеотидов методом ПЦР.

С другой стороны, полинуклеотид, кодирующий антитело, описанное в настоящем описании, можно получить из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) с использованием методов, хорошо известных в технике (например, ПЦР и других методов молекулярного клонирования). Например, амплификацию ПЦР с использованием синтетических праймеров, способных к гибридизации по 3'- и 5'-концам известной последовательности, можно выполнить с использованием геномной ДНК, полученной из клеток гибридом, продуцирующих антитело, представляющее интерес. Такие методы амплификации ПЦР можно использовать для получения нуклеиновых кислот, включающих последовательность, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела. Такие методы амплификации ПЦР можно использовать для получения нуклеиновых кислот, включающих последовательность, кодирующую переменный участок легкой цепи и/или переменный участок тяжелой цепи антитела. Амплифицированные нуклеиновые кислоты можно клонировать в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дальнейшего клонирования, например, для получения химерных и гуманизированных антител.

Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую определенное антитело, недоступен, но последовательность молекулы антитела известна, нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуноглобулин, можно синтезировать химически или получить из подходящего источника (например, библиотеки кДНК антител или библиотеки кДНК, созданной из, или нуклеиновой кислоты, предпочтительно поли А+ РНК, выделенной из, любой ткани или клеток, экспрессирующих антитело, таких как клетки гибридомы, выбранные для экспрессии антитела, описанного в настоящем описании) амплификацией ПЦР с использованием синтетических праймеров, способных к гибридизации по 3'- и 5'-концам последовательности, или клонированием с использованием олигонуклеотидного зонда, специфического для определенной последовательности, для идентификации, например, клона кДНК из библиотеки кДНК, которая кодирует антитело. Затем полученные ПЦР амплифицированные нуклеиновые кислоты можно клонировать в способные к репликации клонирующие векторы с использованием любого метода, хорошо известного в технике.

ДНК, кодирующую анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, можно легко изолировать и секвенировать с использованием обычных процедур (например, используя олигонуклеотидные зонды, которые способны связываться специфически с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи анти-PD-1 антител). Клетки гибридомы могут служить в качестве источника такой ДНК. После изоляции ДНК можно поместить в экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяев, такие как клетки *E. coli*, клетки обезьяны COS, клетки яичников китайского хомячка (CHO) (например, клетки CHO от CHO GS System™ (Lonza)) или клетки миеломы, которые иначе не продуцируют белок иммуноглобулин, и осуществить синтез анти-PD-1 антител в рекомбинантных клетках-хозяевах.

Для того, чтобы получить целые антитела, праймеры ПЦР, включающие нуклеотидные последовательности VL или VH, сайт рестрикции и фланкирующие последовательности для защиты сайта рестрикции, можно использовать для амплификации последовательностей VL или VH в клонах scFv. С использованием методов клонирования, известных специалистам в данной области техники, VH домены, амплифицированные ПЦР, можно клонировать в векторы, экспрессирующие константный участок тяжелой цепи, например, человеческий константный участок гамма 4, и VL домены, амплифицированные ПЦР, можно клонировать в векторы, экспрессирующие константный участок легкой цепи, например, человеческие константные участки каппа или лямбда. В некоторых воплощениях векторы для экспрессии VH или VL доменов включают промотор EF-1α, сигнал секреции, сайт клонирования для переменного участка, константные домены и маркер селекции, такой как неомизин. VH и VL домены также можно клонировать в один вектор, экспрессирующий необходимые константные участки. Затем векторы конверсии тяжелой цепи и векторы конверсии легкой цепи, с использованием методов, известных специалистам в данной области техники, трансфицируют в клеточные линии для получения устойчивых или транзистентных клеточных линий, которые экспрессируют полноразмерные антитела, например, IgG.

ДНК также можно модифицировать, например, путем замены кодирующей последовательностью для константных доменов человеческой тяжелой и легкой цепи мышиных последовательностей или путем ковалентного соединения с кодирующей последовательностью иммуноглобулина всей или части кодирующей последовательности для полипептида неиммуноглобулина.

Изобретение также относится к полинуклеотидам, которые гибридизуют в условиях очень строгой, умеренной или более мягкой гибридизации с полинуклеотидами, которые кодируют антитело, описанное в настоящем описании. В конкретных воплощениях полинуклеотиды, описанные в настоящем описании, гибридизуют в условиях очень строгой, умеренной или более мягкой гибридизации с полинуклеотидами, кодирующими VH домен и/или VL домен, раскрытые в настоящем описании.

Условия гибридизации описаны в технике и известны специалисту в данной области техники. На-

пример, гибридизация в строгих условиях может заключаться в гибридизации со связанной с фильтром ДНК в 6× растворе хлорида натрия/цитрата натрия (SSC) при примерно 45°C с последующими одной или несколькими промывками в 0,2×SSC/0,1% SDS при примерно 50-65°C; гибридизация в высоко строгих условиях может заключаться в гибридизации со связанной с фильтром нуклеиновой кислотой в 6×SSC при примерно 45°C с последующими одной или несколькими промывками в 0,1×SSC/0,2% SDS при примерно 68°C. Гибридизации в других строгих условиях известны специалистам в данной области техники и описаны, см., например, Ausubel FM et al., eds. (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., и John Wiley & Sons, Inc., New York, at pages 6.3.1-6.3.6 and 2.10.3, включенные полностью в настоящее описание в качестве ссылок.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к клеткам (например, клеткам-хозяевам), экспрессирующим (например, рекомбинантно) антитела, описанные в настоящем описании, которые специфически связываются с PD-1 (например, человеческим PD-1), и родственным полинуклеотидам и экспрессирующим векторам. Настоящее изобретение относится к векторам (например, экспрессирующим векторам), включающим полинуклеотиды, включающие нуклеотидные последовательности, кодирующие анти-PD-1 антитела или фрагменты, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, предпочтительно в клетках млекопитающих. Настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, включающим такие векторы для рекомбинантной экспрессии анти-PD-1 антител, описанных в настоящем описании (например, человеческого или гуманизированного антитела). Отдельный аспект относится к способам получения антитела, описанного в настоящем описании, включающим экспрессию такого антитела в клетке-хозяине.

Рекомбинантная экспрессия антитела, описанного в настоящем описании (например, полноразмерного антитела, тяжелой и/или легкой цепи антитела или одноцепного антитела, описанного в настоящем описании), которое специфически связывается с PD-1 (например, человеческим PD-1), включает конструирование вектора, содержащего полинуклеотид, который кодирует антитело. Как только полинуклеотид, кодирующий молекулу антитела, тяжелую и/или легкую цепь антитела или его фрагмент (например, вариабельные участки тяжелой и/или легкой цепи), описанные в настоящем описании, получен, можно получать вектор для продуцирования молекулы антитела по технологии рекомбинантных ДНК с использованием методов, известных в технике. Таким образом, в настоящем описании описаны способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего антитело или фрагмент антитела (например, легкой цепи или тяжелой цепи), кодирующего нуклеотидную последовательность. Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, можно использовать для конструирования экспрессирующих векторов, содержащих антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь), кодирующих последовательностей и соответствующих сигналов контроля транскрипции и трансляции. Такие способы включают, например, методы рекомбинантных ДНК *in vitro*, методы синтеза и генетической рекомбинации *in vivo*. Изобретение также относится к реплицируемым векторам, включающим нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, описанного в настоящем описании, тяжелую или легкую цепь антитела, вариабельный участок тяжелой или легкой цепи антитела или его фрагмент, или CDR тяжелой или легкой цепи, операбельно соединенный с промотором. Такие векторы могут, например, включать нуклеотидную последовательность, кодирующую константный участок молекулы антитела (см., например, международные публикации №№ WO 86/05807 и WO 89/01036; и патент США № 5122464, которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок), и вариабельные участки антитела могут быть клонированы в такой вектор для экспрессии полной тяжелой, полной легкой цепи или как полной тяжелой, так и полной легкой цепи.

Экспрессирующий вектор можно перенести в клетку (например, клетку-хозяина) обычными методами, и затем полученные клетки можно культивировать обычными методами и получить антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент. Таким образом, настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим полинуклеотид, кодирующий антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагменты, или его тяжелую или легкую цепь или их фрагменты или одноцепное антитело, описанное в настоящем описании, операбельно связанное с промотором, для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине. В некоторых воплощениях для экспрессии двухцепочечных антител векторы, кодирующие как тяжелые, так и легкие цепи, по отдельности могут быть коэкспрессированы в клетке-хозяине для экспрессии полной молекулы иммуноглобулина, что подробно описано ниже. В некоторых воплощениях клетка-хозяин содержит вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий как тяжелую, так и легкую цепь антитела, описанного в настоящем описании, или его фрагмента. В конкретных воплощениях клетка-хозяин содержит два различных вектора, причем первый вектор включает полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или вариабельный участок тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем описании, или его фрагмента, и второй вектор включает полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или вариабельный участок легкой цепи антитела, описанного в настоящем описании, или его фрагмента. В других воплощениях первая клетка-хозяин включает первый вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или вариабельный участок тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем описании, или его фрагмента, и вторая клетка-хозяин включает второй вектор, включающий

полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или вариабельный участок легкой цепи антитела, описанного в настоящем описании. В конкретных воплощениях тяжелая цепь/вариабельный участок тяжелой цепи, экспрессированные первой клеткой, ассоциируются с легкой цепью/вариабельным участком легкой цепи второй клетки с образованием анти-PD-1 антитела, описанного в настоящем описании. Некоторые воплощения относятся к популяции клеток-хозяев, включающей такую первую клетку-хозяина и такую вторую клетку-хозяина.

Отдельное воплощение относится к популяции векторов, включающих первый вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь/вариабельный участок легкой цепи анти-PD-1 антитела, описанного в настоящем описании, и второй вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь/вариабельный участок тяжелой цепи анти-PD-1 антитела, описанного в настоящем описании.

Ряд систем хозяин-экспрессирующий вектор можно использовать для экспрессии молекул антител, описанных в настоящем описании (см., например, патент США № 5807715, который полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки). Такие системы хозяин-экспрессирующий вектор представляют собой среды, с помощью которых можно получить и затем очистить интересующие кодирующие последовательности, но также представляют собой клетки, которые могут, когда трансформированы или трансфицированы соответствующими нуклеотидными последовательностями, экспрессировать *in situ* молекулы антитела, описанного в настоящем описании. Они включают, но без ограничения, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные экспрессирующими векторами рекомбинантной ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими последовательности, кодирующие антитело; дрожжи (например, *Saccharomyces Pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессирующими векторами, содержащими последовательности, кодирующие антитело; системы клеток насекомых, инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, бакуловирусом), содержащими последовательности, кодирующие антитело; системы клеток растений (например, зеленых водорослей, таких как (*Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, вирусом мозаики цветной капусты CaMV; вирусом мозаики табака TMV), или трансформированные рекомбинантными плазмидными экспрессирующими векторами (например, плазмидой Ti), содержащими последовательности, кодирующие антитело; или системы клеток млекопитающих (например, клетки COS (например, COS1 или COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 и BMT10), содержащие рекомбинантные экспрессирующие конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающего (например, металлотионеиновый промотор) или из вирусов млекопитающих (например, аденовирусный поздний промотор; промотор 7,5K вируса коровьей оспы). В конкретном воплощении клетками для экспрессии антител, описанных в настоящем описании, являются клетки CHO, например, клетки CHO из системы CHO GS System™ (Lonza). В отдельном воплощении клетками для экспрессии антител, описанных в настоящем описании, являются человеческие клетки, например, человеческие клеточные линии. В конкретном воплощении экспрессирующим вектором млекопитающего является рOptiVEC™ или pcDNA3.3. В отдельном воплощении для экспрессии рекомбинантной молекулы антитела используют бактериальные клетки, такие как клетки *Escherichia coli*, или эукариотные клетки (например, клетки млекопитающего), особенно для экспрессии целой рекомбинантной молекулы антитела. Например, клетки млекопитающего, такие как клетки яичников китайского хомячка (CHO), в конъюгации с вектором, таким как главный промежуточный элемент раннего генного промотора из цитомегаловируса у человека, является эффективной экспрессирующей системой для антител (Foelcking MK & Hofstetter H. (1986), Gene 45: 101-5 и Cockett MI et al. (1990), Biotechnology, 8(7): 662-7, обе работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок). В некоторых воплощениях антитела, описанные в настоящем описании, продуцируются клетками CHO или клетками NS0. В конкретном воплощении экспрессия нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела, описанные в настоящем описании, которые специфически связывают PD-1 (например, человеческий PD-1), регулируется конститутивным промотором, индуцируемым промотором или тканеспецифическим промотором.

В бактериальных системах число экспрессирующих векторов может быть выгодно выбрано в зависимости от применения, предназначенного для молекулы антитела, которое экспрессируется. Например, когда следует получить большое количество такого антитела для получения фармацевтической композиции с молекулами антитела, могут быть желательны векторы, которые управляют экспрессией высоких уровней продуктов слитых белков, которые легко очищаются. Такие векторы включают, но без ограничения, экспрессирующий вектор *E. coli* pUR278 (Ruether U. & Mueller-Hill B. (1983), EMBO J., 2: 1791-1794), в который кодирующая антитело последовательность может быть лигирована отдельно в вектор в рамке с *lac Z* кодирующим участком, так что продуцируется слитый белок; векторы pIN (Inouye S & Inouye M. (1985), Nuc. Acids Res., 13: 3101-3109; Van Heeke G. & Schuster SM (1989), J. Biol. Chem., 24: 5503-5509) и т.п., и все указанные работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. Например, векторы pGEX также можно использовать для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион-5-трансферазой (GST). Как правило, такие слитые белки являются раствори-

мыми и могут быть легко очищены из лизированных клеток путем абсорбции и связывания с гранулами глутатион-агарозной матрицы с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX создают для включения сайтов расщепления протеаз тромбина или фактора Ха, так что клонированный генный продукт-мишень может высвободиться из частицы GST.

В системе насекомых вирус ядерного полиэдрома *Autographa californica* (AcNPV), например, можно использовать в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Вирус размножается в клетках *Sporoptera frugiperda*. Кодированную последовательность можно клонировать отдельно в несущественные участки (например, ген полэдрин) вируса и поместить под контроль промотора AcNPV (например, полиэдринового промотора).

В клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать ряд экспрессирующих систем на основе вирусов. В случаях, когда используют аденовирус в качестве экспрессирующего вектора, интересующую кодирующую последовательность можно лигировать с аденовирусным комплексом контроля транскрипции/трансляции, например, поздним промотором, и трехчастной лидерной последовательностью. Затем такой химерный ген можно встроить в геном аденовируса рекомбинацией *in vitro* или *in vivo*. Вставка в несущественный участок вирусного генома (например, участок E1 или E3) приведет к рекомбинантному вирусу, который является жизнеспособным и способным к экспрессии молекулы антигена в инфицированных хозяевах (например, см. Logan J. & Shenk T. (1984), PNAS, 81(12): 3655-9, включенную полностью в настоящее описание в качестве ссылки). Для эффективной трансляции встроенных кодирующих последовательностей также могут потребоваться специфические сигналы инициации. Такие сигналы включают иницирующий кодон ATG и соседние последовательности. Кроме того, иницирующий кодон должен находиться в фазе с рамкой считывания желательной кодирующей последовательности для гарантии трансляции полной вставки. Такие экзогенные сигналы контроля трансляции и иницирующие кодоны могут быть разного происхождения, как природного, так и синтетического. Эффективность экспрессии можно усилить путем инклюзии соответствующих энхансерных элементов транскрипции, терминаторов транскрипции и т.д. (см., например, Bitter G. et al. (1987), Methods Enzymol., 153: 516-544, полностью включенную в настоящее описание в качестве ссылки).

Кроме того, можно выбрать штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию встроенных последовательностей или модифицирует и процессирует генный продукт определенного желательного типа. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессирование (например, расщепление) белковых продуктов может быть важным для функции белка. Охарактеризованы различные клетки-хозяева и специфические механизмы посттрансляционного процессирования и модификации белков и генных продуктов. Соответствующие клеточные линии или системы хозяев можно выбрать для гарантии правильной модификации и процессинга чужеродных экспрессированных белков. С этой целью можно использовать эукариотные клетки-хозяев, которые обладают клеточной механикой для надлежащего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, но без ограничения, клетки CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NS0 (клеточная линия мышины миеломы, которая эндогенно не продуцирует какие-либо цепи иммуноглобулина), CRL7030, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, Hs578Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 и Hs578Bst. В некоторых воплощениях анти-PD-1 антигена, описанные в настоящем описании, продуцируются в клетках млекопитающего, таких как клетки CHO.

В конкретном воплощении антигена, описанные в настоящем описании, имеют пониженное содержание фукозы или не содержат фукозу. Такие антигены можно получить с использованием методов, известных специалистам в данной области техники. Например, антигены можно экспрессировать в клетках с дефицитом или отсутствием способности к фукозилированию. В конкретном примере клеточные линии с нокаутом обоих аллелей α -1,6-фукозилтрансферазы можно использовать для получения антигенов с пониженным содержанием фукозы. Система Potelligent® (Lonza) является примером такой системы, которую можно использовать для получения антигенов с пониженным содержанием фукозы.

Можно получить клетки, устойчиво экспрессирующие рекомбинантные белки с высоким выходом в течение длительного времени. Например, можно сконструировать клеточные линии, которые устойчиво экспрессируют анти-PD-1 антиген, описанный в настоящем описании. В конкретных воплощениях клетка по настоящему изобретению устойчиво экспрессирует легкую цепь/вариабельный участок легкой цепи и тяжелую цепь/вариабельный участок тяжелой цепи, которые ассоциируются с образованием антигена, описанного в настоящем описании.

В некоторых аспектах клетки-хозяева можно трансформировать не с использованием экспрессирующих векторов, которые содержат вирусные ориджины репликации, а с помощью ДНК, регулируемой соответствующими контролирующими экспрессию элементами (например, промотором, энхансером, последовательностями, терминаторами транскрипции, сайтами полиаденилирования и т.д.) и селективируемым маркером. После введения чужеродной ДНК/полинуклеотида сконструированные клетки можно оставить для роста в течение 1-2 дней в обогащенных средах и затем перевести в селективные среды. Селектируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает сопротивление селекции и позволяет клет-

кам устойчиво интегрировать плазмиду в их хромосомы и расти с образованием очагов, которые в свою очередь можно клонировать и размножать в клеточные линии. Такой метод можно выгодно использовать для инжиниринга клеточных линий, которые экспрессируют анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент. Такие сконструированные клеточные линии можно использовать особенно при скрининге и оценке композиций, которые прямо или косвенно взаимодействуют с молекулой анти-тела.

Можно использовать ряд систем селекции, включая, но без ограничения, гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler M. et al. (1977), *Cell*, 11(1): 223-32), гипоксантингуанинфосфорибозил-трансферазы (Szybalska EH & Szybalski W. (1962), *PNAS*, 48(12): 2026-2034) и аденинфосфорибозил-трансферазы (Lowy I. et al. (1980), *Cell*, 22(3): 817-23) в tk-, hgprr- или aprt-клетках, соответственно, все указанные работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. Также устойчивость к антиметаболитам можно использовать как основу селекции для следующих генов: dhfr, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler M. et al. (1980), *PNAS*, 77(6): 3567-70; O'Hare K. et al. (1981), *PNAS*, 78: 1527-31); gpt, который придает устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan RC & Berg P. (1981), *PNAS*, 78(4): 2072-6); neo, который придает устойчивость к аминогликозиду G-418 (Wu GY & Wu CH (1991), *Biotherapy*, 3: 87-95; Tolstoshev P. (1993), *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32: 573-596; Mulligan RC (1993), *Science*, 260: 926-932; и Morgan RA & Anderson WF (1993), *Ann. Rev. Biochem.*, 62: 191-217; Nabel GJ & Feigner PL (1993), *Trends Biotechnol.*, 11(5): 211-5); и hygR, который придает устойчивость к гидромицину (Santerre RF et al. (1984), *Gene*, 30(1-3): 147-56), все указанные работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. Можно по традиции применить методы, обычно известных в технологии рекомбинантных ДНК для селекции желательного рекомбинантного клона, и такие методы описаны, например, в Ausubel FM et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler M., *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); и в Chapters 12 and 13, Dracopoli NC et al. (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colbère-Garapin F. et al. (1981), *J. Mol. Biol.*, 150: 1-14, полностью включенных в настоящее описание в качестве ссылок.

Уровни экспрессии молекулы антитела можно повысить путем амплификации вектора (обзор см. в Bebbington CR & Hentschel CCG, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987), полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки). Когда маркер в векторной системе, экспрессирующей антитело, можно амплифицировать, возрастание уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина, будет повышать число копий маркерного гена. Так как амплифицированный участок ассоциируется с геном антитела, продуцирование антитела также будет повышаться (Crouse GF et al. (1983), *Mol. Cell. Biol.*, 3: 257-66, статья полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

Клетку-хозяина можно котрансфицировать двумя или больше экспрессирующими векторами, описанными в настоящем описании, причем первый вектор кодирует тяжелую цепь, происходящую из пептида, и второй вектор кодирует легкую цепь, происходящую из пептида. Два вектора могут содержать идентичные селектируемые маркеры, которые дают возможность равной экспрессии полипептидов тяжелой и легкой цепи. Клетки-хозяева можно котрансфицировать различными количествами двух или больше экспрессирующих векторов. Например, клетки-хозяева можно котрансфицировать при любом соотношении первого экспрессирующего вектора и второго экспрессирующего вектора из следующих: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 или 1:50.

С другой стороны, можно использовать один вектор, который кодирует и способен экспрессировать полипептиды как тяжелой, так и легкой цепи. В таких ситуациях легкая цепь должна размещаться прежде тяжелой цепи для того, чтобы избежать избытка токсичной свободной тяжелой цепи (Proudfoot NJ (1986), *Nature*, 322: 562-565; и Köhler G. (1980), *PNAS*, 77: 2197-2199, обе работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок). Кодированные последовательности для тяжелых и легких цепей могут включать кДНК или геномную ДНК. Экспрессирующий вектор может быть моноцистронным или мультицистронным. Мультицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может кодировать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше или в интервале 2-5, 5-10 или 10-20 генных/нуклеотидных последовательностей. Например, бицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может включать, в следующем порядке, промотор, первый ген (например, тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем описании) и второй ген (например, легкой цепи антитела, описанного в настоящем описании). В таком экспрессирующем векторе транскрипция обоих генов может управляться промотором, в то время как трансляция мРНК из первого гена может управляться кэп-зависимым сканирующим механизмом, и трансляция мРНК из второго гена может осуществляться с помощью кэп-зависимого механизма, например, с помощью IRES.

Как только молекула антитела, описанного в настоящем описании, получена рекомбинантной экспрессией, ее можно очистить любым методом, известным в технике для очистки молекулы иммуноглобулина, например, хроматографией (например, ионообменной, аффинной, в особенности аффинной для специфического антигена после белка А, и эксклюзионной колоночной хроматографией), центрифугированием, дифференцирующим растворением, или любым другим стандартным методом очистки белков. Кроме того, антитела, описанные в настоящем описании, можно слить с гетерологичными полипептид-

ными последовательностями, описанными в настоящем описании, или иначе, что известно в технике для облегчения очистки.

В конкретных воплощениях антитела, описанное в настоящем описании, изолируют или очищают. Как правило, изолированное антитело является антителом, которое по существу свободно от других антител с иной антигенной специфичностью, чем изолированное антитело. Например, в отдельном воплощении препарат антитела, описанного в настоящем описании, по существу свободен от клеточного материала и/или химических предшественников. Выражение "по существу свободен от клеточного материала" включает препараты антитела, в которых антитело отделено от клеточных компонентов клеток, из которых его выделили, или в которых получили рекомбинантно. Таким образом, антитело, которое по существу свободно от клеточного материала, включает препараты антитела, имеющие менее примерно 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (на сухую массу) гетерологичного белка (также называемого в настоящем описании "загрязняющим белком") и/или вариантов антитела, например, различных посттрансляционных модифицированных форм антитела, или других версий антитела (например, фрагментов антитела). Когда антитело получено рекомбинантно, оно также, как правило, по существу свободно от культуральной среды, т.е., культуральная среда представляет менее примерно 20%, 10%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% объема белкового препарата. Когда антитело получено химическим синтезом, оно, как правило, по существу свободно от химических предшественников или других химических веществ, т.е., оно отделено от химических предшественников или других химических веществ, которые участвовали в синтезе белка. Соответственно, такие препараты антитела имеют менее примерно 30%, 20%, 10% или 5% (на сухую массу) химических предшественников или соединений иных, чем интересующее антитело. В конкретном воплощении антитела, описанные в настоящем описании, являются изолированными или очищенными.

Антитела или их фрагменты, которые специфически связываются с PD-1 (например, человеческим PD-1), можно получить любым способом, известным в технике для синтеза антител, например, химическим синтезом или методами рекомбинантной экспрессии. В способах, описанных в настоящем описании, используются, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии, методологии, генетического анализа, рекомбинантных ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и областей, родственных данной области техники. Такие методы описаны, например, в ссылках, цитированных в настоящем описании, и в полной мере объяснены в литературе. См., например, Maniatis T. et al. (1982), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J. et al. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J. et al. (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 and annual updates); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 ежегодные новости); Gait (ed.) (1984), *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991); *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B et al., (eds.) (1999; *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, все полностью включенные в настоящее описание в качестве ссылок.

В конкретном воплощении антитело, описанное в настоящем описании (например, рекомбинантное антитело), получают, экспрессируют, создают или очищают любыми способами, которые включают создание, например, через синтез, последовательностей ДНК методами генной инженерии. В некоторых воплощениях такое антитело включает последовательности (например, последовательности ДНК или аминокислотные последовательности), которые не существуют в природе в зародышевом репертуаре антител животного или млекопитающего (например, человека) *in vivo*.

Один аспект настоящего изобретения относится к способу получения антитела, которое специфически связывается с PD-1 (например, человеческим PD-1), включающему культивирование клетки или клетки-хозяина, описанных в настоящем описании. Некоторый аспект настоящего изобретения относится к способу получения антитела, которое специфически связывается с PD-1 (например, человеческим PD-1), включающему экспрессию (например, рекомбинантную экспрессию) антитела с использованием клетки или клетки-хозяина, описанных в настоящем описании (например, клетки или клетки-хозяина, включающих полинуклеотиды, кодирующие антитело, описанное в настоящем описании). В отдельном воплощении клетка является изолированной клеткой. В отдельном воплощении способ дополнительно включает стадию очистки антитела, полученного из клетки или клетки-хозяина.

Способы получения поликлональных антител известны в технике (см., например, главы 11 в *Short Protocols in Molecular Biology* (2002), 5th Ed., Ausubel FM et al., eds., John Wiley and Sons, New York, полностью включенную в настоящее описание в качестве ссылки).

Моноклональные антитела можно получить с использованием широкого ряда методов, известных в технике, включающих использование гибридом, рекомбинатов, и методы фагового дисплея, или их комбинации. Например, моноклональные антитела можно получить с использованием методов гибридом, включая методы, известные в технике, и описанные, например, в Harlow E & Lane D., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling GJ et al., в *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, 563, 681 (Elsevier, N.Y., 1981), полностью включенных в настоящее описа-

ние в качестве ссылок. Термин "моноклональное антитело", используемый в настоящем описании, не ограничивается антителами, полученными технологией гибридом. Например, моноклональные антитела можно получить рекомбинантно из клеток-хозяев, экзогенно экспрессирующих антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент, например, легкую цепь и/или тяжелую цепь такого антитела.

В конкретном воплощении "моноклональное антитело" при использовании в настоящем описании является антителом, продуцированным одной клеткой (например, гибридомой или клеткой-хозяином, продуцирующей рекомбинантное антитело), причем антитело специфически связывается с PD-1 (например, человеческим PD-1) при определении ELISA или другим анализом связывания антигена или конкурентного связывания, известным в технике, или описанным в примерах в настоящем описании. В отдельных воплощениях моноклональное антитело может являться химерным антителом или гуманизированным антителом. В некоторых воплощениях моноклональное антитело представляет собой моновалентное антитело или поливалентное (например, бивалентное) антитело. В отдельных воплощениях моноклональное антитело является моноспецифическим или мультиспецифическим антителом (например, биспецифическим антителом). Моноклональные антитела, описанные в настоящем описании, можно, например, получить методом гибридом, описанным в Kohler G. & Milstein C. (1975), *Nature*, 256: 495, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки, или можно, например, выделить из фазовых библиотек с использованием методов, описанных в настоящем описании, например. В технике хорошо известны другие способы получения клонированных клеточных линий и моноклональных антител, экспрессированных посредством их (см., главу 11 в *Short Protocols in Molecular Biology* (2002), 5th Ed., Ausubel FM et al., цит. выше).

Способы получения и скрининга специфических антител с использованием технологии гибридом являются рутинными и хорошо известны в технике. Например, в методе гибридом мышь или другое соответствующее животное-хозяина, такое как овца, коза, кролик, хомячок или обезьяна, иммунизируют для выявления лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с белком (например, PD-1 (например, человеческим PD-1)), используемым для иммунизации. С другой стороны, лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы с использованием подходящего агента слияния, такого как полиэтиленгликоль, с образованием клетки гибридомы (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986), полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Кроме того, для иммунизации животного можно использовать метод RIMMS (несколько мест повторной иммунизации) (Kilpatrick KE et al. (1997), *Hybridoma*, 16: 381-9, полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

В некоторых воплощениях мышей (или других животных, таких как крысы, обезьяны, ослы, свиньи, овцы, хомячки или собаки) можно иммунизировать антигеном (например, PD-1 (например, человеческим PD-1)), и как только иммунную реакцию детектируют, например, антитела, специфические для антигена, детектируют в мышинной сыворотке, селезенку мыши собирают, и изолируют спленоциты. Затем спленоциты сливают хорошо известными методами с какими-либо подходящими миеломными клетками, например, клетками из клеточной линии SP20, доступной от Американской коллекции типовых культур (ATCC) (Манассас, Виргиния), с образованием гибридом. Гибридомы отбирают и клонируют методом предельного разведения. В некоторых воплощениях собирают лимфоузлы иммунизированных мышей и сливают с миеломными клетками NS0.

Затем полученные клетки гибридомы высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, которые ингибируют рост или выживание неслитых исходных клеток миеломы. Например, если исходные клетки миеломы утрачивают фермент гипоксантингуанинфосфорибозил-трансферазу (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридом типично будет включать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), которые предотвращают рост HGPRT-дефицитных клеток.

В конкретных воплощениях используют миеломные клетки, которые эффективно сливаются, поддерживают устойчивое на высоком уровне продуцирование антитела отобранными продуцирующими антитело клетками и чувствительны к среде, такой как среда HAT. К числу таких клеточных линий относятся клетки миеломы мышей, такие как клеточная линия NS0, или клетки, полученные из мышинных опухолей MOPC-21 и MPC-11, доступные от Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, USA, и клетки SP-2 или X63-Ag8.653, доступные от Американской коллекции типовых культур, MD, USA. Описаны также клеточные линии миеломы человека и гетеромиеломные клетки мыши-человека для получения человеческих моноклональных антител (Kozbor D. (1984), *J. Immunol.*, 133: 3001-5; Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987), полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок).

Культуральную среду, в которой выращивают клетки гибридомы, оценивают на продуцирование моноклональных антител, направленных против PD-1 (например, человеческого PD-1). Специфичность связывания моноклональных антител, продуцированных клетками гибридомы, определяют методами, известными в технике, например, иммунопреципитацией или анализом связывания *in vitro*, таким как радиоиммуноанализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

После того, как идентифицированы клетки гибридомы, которые продуцируют антитела желательной специфичности, аффинности и/или активности, клоны можно субклонировать процедурами предельного разведения и выращивать стандартными методами (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, цит. выше). Подходящие культуральные среды для такой цели включают, например, среду D-MEM или RPMI 1640. Кроме того, клетки гибридомы можно выращивать *in vivo* как асцитические опухоли у животного.

Моноклональные антитела, секретированные субклонами, соответственно отделяют от культуральной среды, асцитической жидкости или сыворотки обычными процедурами очистки иммуноглобулина, такими как, например, хроматография на белок А-сепарозе, гидроксилапатите, гелеэлектрофорез, диализ или аффинная хроматография.

Антитела, описанные в настоящем описании, включают фрагменты антитела, которые узнают специфический PD-1 (например, человеческий PD-1), и могут быть получены любым методом, известным специалистам в данной области техники. Например, фрагменты Fab и F(ab')₂, описанные в настоящем описании, можно получить протеолитическим расщеплением молекул иммуноглобулина с использованием ферментов, таких как папаин (для получения фрагментов Fab) или пепсин (для получения фрагментов F(ab')₂). Фрагмент Fab соответствует одному из двух идентичных плечей молекулы антитела и содержит полную легкую цепь в паре с доменами VH и CH1 тяжелой цепи. Фрагмент F(ab')₂ содержит два антигенсвязывающих плеча молекулы антитела, соединенных дисульфидными связями в шарнирном участке.

Кроме того, антитела, описанные в настоящем описании, также можно получить с использованием различных методов фагового дисплея, известных в технике. В методах фагового дисплея функциональные домены антитела отображаются на поверхности фаговых частиц, которые содержат полинуклеотидные последовательности, кодирующие их. В частности, последовательности ДНК, кодирующие домены VH и VL, амплифицируют из библиотек кДНК животных (например, библиотек человеческих и мышинных кДНК пораженных тканей). ДНК, кодирующие домены VH и VL, рекомбинируют вместе с линкером scFv ПЦР и клонируют в фagemидный вектор. Вектор подвергают электропорации в *E. coli* и *E. coli* инфицируют хелперным фагом. Фаги, используемые в таких методах, типично являются нитчатыми фагами, включая fd и M13, и домены VH и VL обычно рекомбинантно сливаются с фаговым геном III или геном VIII. Фаг, экспрессирующий антигенсвязывающий домен, который связывается с определенным антигеном, можно отобрать или идентифицировать с помощью антигена, например, с использованием меченного антигена или антигена, связанного с или захваченного на твердой поверхности или грануле. Примеры методов фагового дисплея, которые можно использовать для получения антител, описанных в настоящем описании, включают методы, раскрытые в Brinkman U. et al. (1995), *J. Immunol. Methods*, 182: 41-50; Ames RS et al. (1995), *J. Immunol. Methods*, 184: 177-186; Kettleborough CA et al. (1994), *Eur. J. Immunol.*, 24: 952-958; Persic L. et al. (1997), *Gene*, 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994), *Advan. Immunol.*, 57: 191-280; заявке PCT № PCT/GB91/001134; международных публикациях №№ WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 и WO 97/13844 и патентах США №№ 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 и 5969108, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Как описано в указанных выше ссылках, после селекции фага можно изолировать антителокодирующие участки из фага и использовать для получения целых антител, включая человеческие антитела, или любой другой желательный антигенсвязывающий фрагмент и экспрессировать в любом желательном хозяине, включая клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений, дрожжи и бактерии, например, описанные ниже. Методы рекомбинантного продуцирования фрагментов антител, таких как фрагменты Fab, Fab' и F(ab')₂, также можно использовать с использованием методов, известных в технике, таких как методы, описанные в публикации PCT № WO 92/22324; в Mullinax RL et al. (1992), *Bio-Techniques*, 12(6): 864-9; Sawai H. et al. (1995), *Am. J. Reprod. Immunol.*, 34: 26-34; и в Better M. et al. (1988), *Science*, 240: 1041-1043, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

В некоторых воплощениях для получения целых антител можно использовать праймеры ПЦР, включая нуклеотидные последовательности VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции для амплификации последовательностей VH или VL из матрицы, например, клонов scFv. С использованием методов клонирования, известных специалистам в данной области техники, ПЦР-амплифицированные VH домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие константный VH участок, и ПЦР-амплифицированные VL домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие константный VL участок например, человеческие константные участки каппа или лямбда. VH и VL домены также можно клонировать в один вектор, экспрессирующий необходимые константные участки. Затем векторы конверсии тяжелой цепи и векторы конверсии легкой цепи котрансфицируют в клеточные линии для получения устойчивых или транзистентных клеточных линий, которые экспрессируют полноразмерные антитела, например, IgG, с использованием методов, известных специалистам в данной области техники.

Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой различные части антитела происходят из различных молекул иммуноглобулина. Например, химерное антитело может содержать вариабельный участок мышинового или крысиного антитела, слитый с константным участком человеческого антитела. Методы получения химерных антител известны в технике. См., например, Morrison SL (1985), *Science*, 229: 1202-7; Oi VT & Morrison SL (1986), *BioTechniques*, 4: 214-221; Gillies SD et al. (1989), *J. Immunol. Methods*, 125: 191-202 и патенты США №№ 5807715, 4816567, 4816397 и 6331415, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Гуманизированное антитело способно связываться с заданным антигеном и включает каркасный участок, имеющий, по существу, аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина и CDR, имеющие по существу аминокислотную последовательность нечеловеческого иммуноглобулина (например, мышинового иммуноглобулина). В отдельных воплощениях гуманизированное антитело также включает по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), типично константного участка человеческого иммуноглобулина. Антитело также может включать CH1, шарнир, участки CH2, CH3 и CH4 тяжелой цепи. Гуманизированное антитело можно выбрать из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA and IgE, и любого изотипа, включая IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. Гуманизированные антитела можно получить с использованием ряда методов, известных в технике, включая, но без ограничения, CDR-прививку (Европейский патент № EP 239400; международная публикация № WO 91/09967; и патенты США №№ 5225539, 5530101 и 5585089), вениринг или изменение поверхности (Европейские патенты №№ EP 592106 и EP 519596; Padlan EA (1991), *Mol. Immunol.*, 28(4/5): 489-498; Studnicka GM et al. (1994), *Prot. Engineering*, 7(6): 805-814 и Roguska MA et al. (1994), *PNAS*, 91: 969-973), перестановку цепей (патент США № 5565332), и методы, описанные, например, в патенте США № 6407213, патенте США № 5766886, международной публикации № WO 93/17105; Tan P. et al. (2002), *J. Immunol.*, 169: 1119-25; Caldas C. et al. (2000), *Protein Eng.*, 13(5): 353-60; Morea V. et al. (2000), *Methods*, 20(3): 267-79; Baca M. et al. (1997), *J. Biol. Chem.*, 272(16): 10678-84; Roguska MA et al. (1996), *Protein Eng.*, 9(10): 895-904; Couto JR et al. (1995), *Cancer Res.*, 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto JR et al. (1995), *Cancer Res.*, 55(8): 1717-22; Sandhu JS (1994), *Gene* 150(2): 409-10, и Pedersen JT et al. (1994), *J. Mol. Biol.*, 235(3): 959-73, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. См. также публикацию заявки на патент США № US 2005/0042664 A1 (24 февр. 2005), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Описаны методы получения мультиспецифических (например, биспецифических) антител, см., например, патенты США №№ 7951917, 7183076, 8227577, 5837242, 5989830, 5869620, 6132992 и 8586713, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Однодоменные антитела, например, антитела, лишённые легких цепей, можно получить методами, хорошо известными в технике. См. Riechmann L. & Muyldermans S. (1999), *J. Immunol.*, 231: 25-38; Nuttall SD et al. (2000), *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 1(3): 253-263; Muyldermans S. (2001), *J. Biotechnol.*, 74(4): 277-302; патент США № 6005079 и международные публикации №№ WO 94/04678, WO 94/25591 и WO 01/44301, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Кроме того, антитела, которые специфически связываются с антигеном PD-1, можно, в свою очередь, использовать для получения антиидиотипических антител, которые "имитируют" антиген, с использованием методов, хорошо известных специалистам в данной области техники. См., например, Greenspan NS & Bona CA (1989), *FASEB J.*, 7(5): 437-444; и Nissinoff A. (1991), *J. Immunol.*, 147(8): 2429-2438, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

В отдельных воплощениях антитело, описанное в настоящем описании, которое связывается с тем же эпитопом PD-1 (например, человеческого PD-1), что и анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, является человеческим антителом. В отдельных воплощениях антитело, описанное в настоящем описании, которое конкурентно блокирует (например, в зависимости от дозы) любое из антител, описанных в настоящем описании, от связывания с PD-1 (например, человеческим PD-1), является человеческим антителом. Человеческие антитела можно получить с использованием любого метода, известного в технике. Например, можно использовать трансгенных мышей, которые неспособны экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но которые могут экспрессировать гены человеческого иммуноглобулина. В частности, комплексы генов человеческих тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина можно ввести случайно или путем гомологичной рекомбинации. С другой стороны, в эмбриональные стволовые клетки мыши, кроме генов человеческих тяжелой и легкой цепи, можно ввести человеческий вариабельный участок, константный участок и дополнительный участок. Гены мышинных тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина могут быть представлены нефункциональными отдельно или одновременно с введением локусов человеческого иммуноглобулина путем гомологичной рекомбинации. В частности, гомозиготная делеция участка J_H предотвращает продуцирование эндогенных антител. Вырашивают модифицированные эмбриональные стволовые клетки и инъецируют в бластоциты, и получают химерных мышей. Затем химерных мышей размножают для получения гомозиготного потомства, которое экспрессирует антитела. Трансгенных мышей обычным образом иммунизируют выбранным антигеном, например, всем или частью антигена (например, PD-1). Моноклональные антитела, направленные против антигена, можно получить от иммунизированных трансгенных мышей с использованием обыч-

ной гибридной технологии. Трансгены человеческого иммуноглобулина, укрытые трансгенными мышами, перестраиваются во время дифференцировки В-клеток и затем претерпевают переключение класса и соматическую мутацию. Таким образом, с использованием такого метода возможно получить терапевтически применимые антитела IgG, IgA, IgM и IgE. Обзор такой технологии для получения человеческих антител см. в Lonberg N. & Huszar D. (1995), *Int. Rev. Immunol.*, 13: 65-93, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки. Подробное раскрытие такой технологии для получения человеческих антител и человеческих моноклональных антител и протоколы получения таких антител см., например, в международных публикациях №№ WO 98/24893, WO 96/34096 и WO 96/33735 и патентах США №№ 5413923, 5625126, 5633425, 5569825, 5661016, 5545806, 5814318 и 5939598, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. Примеры мышей, способных продуцировать человеческие антитела, включают Xenomouse™ (Abgenix, Inc.; патенты США №№ 6075181 и 6150184), HuAb-Mouse™ (Medarex, Inc./Gen Pharm; патенты США №№ 5545806 и 5569825), Trans Chromo Mouse™ (Kirin) и KM Mouse™ (Medarex/Kirin), где все работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Человеческие антитела, которые специфически связываются с PD-1 (например, человеческим PD-1), можно получить рядом методов, известных в технике, включая методы фагового дисплея, описанные выше, с использованием библиотек антител, полученных из последовательностей человеческих иммуноглобулинов. См. также патенты США №№ 4444887, 4716111 и 5885793; и международные публикации №№ WO 98/4 6645, WO 98/504 33, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

В некоторых воплощениях человеческие антитела можно получить с использованием гибридом мышь-человек. Например, лимфоциты периферической крови человека, трансформированные вирусом Эпштейна-Барра (EBV), можно слить с клетками миеломы мыши и получить гибридомы мышь-человек, секретирующие человеческие моноклональные антитела, и такие гибридомы мышь-человек можно скринировать для определения гибридом, которые секретируют человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с антигеном-мишенью (например, PD-1 (например, человеческим PD-1)). Такие методы известны и описаны в технике, см., например, Shinmoto H. et al. (2004), *Cytotechnology*, 46: 19-23; Naganawa Y. et al. (2005), *Human Antibodies*, 14: 27-31, которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

5.6. Наборы

Изобретение также относится к наборам, включающим одно или несколько антител, описанных в настоящем описании, или их фармацевтические композиции или конъюгаты. Конкретное воплощение относится к фармацевтической упаковке или набору, включающим один или несколько контейнеров, заполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций, описанных в настоящем описании, такими как одно или несколько антител, описанных в настоящем описании. В некоторых воплощениях наборы содержат фармацевтическую композицию, описанную в настоящем описании, и любое профилактическое или терапевтическое средство, такое как описанные в настоящем описании. В некоторых воплощениях наборы могут содержать Т-клеточный митоген, такой как, например, фитогемагглютинин (PHA) и/или форболмиристатацетат (PMA), или антитело, стимулирующее TCR-комплекс, такое как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело. Необязательно в ассоциации с таким(и) контейнером(ами) может находиться уведомление в форме, предписанной правительственным учреждением, регулирующим изготовление, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, в котором отражено одобрение учреждением изготовления, применения или продажи для назначения человеку.

Изобретение также относится к наборам, которые можно использовать в описанных выше методах. В одном воплощении набор включает антитело, описанное в настоящем описании, предпочтительно очищенное антитело, в одном или нескольких контейнерах. В конкретном воплощении наборы, описанные в настоящем описании, содержат, по существу, изолированный антиген PD-1 (например, человеческий PD-1) как контроль. В другом конкретном воплощении наборы, описанные в настоящем описании, содержат контрольное антитело, которое не взаимодействует с антигеном PD-1. В другом конкретном воплощении наборы, описанные в настоящем описании, содержат один или несколько элементов для детекции связывания антитела с антигеном PD-1 (например, антитело может быть конъюгировано с детектируемым субстратом, таким как флуоресцентное соединение, ферментативный субстрат, радиоактивное соединение или люминесцентное соединение, или второе антитело, которое узнает первое антитело, может быть конъюгировано с детектируемым субстратом). В конкретных воплощениях набор, описанный в настоящем описании, может включать антиген PD-1, полученный рекомбинантно или синтезированный химически. Антиген PD-1, представленный в наборе, также может быть присоединен к твердой основе. В более конкретном воплощении средство для детекции в вышеописанном наборе включает твердую подложку, к которой присоединен антиген PD-1. Такой набор также может включать неприсоединенное репортерное меченое античеловеческое антитело или антимышиное/крысиное антитело. В таком воплощении связывание антитела с антигеном PD-1 можно обнаружить путем связывания указан-

ного репортерного меченного антитела. В одном воплощении настоящее изобретение относится к применению набора по настоящему изобретению для *in vitro* анализа и/или детекции антигена PD-1 (например, человеческого PD-1) в биологическом образце.

6. Примеры

Примеры в данном разделе (т.е., разделе 6) предлагаются для пояснения, но не для ограничения изобретения.

6.1. Пример 1. Характеризация анти-PD-1 антител

В этом примере описывается характеристика антител, которые специфически связываются с человеческим PD-1, в частности, антитела, обозначенные AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w и AGEN2047w. AGEN2033w и AGEN2046w разделяют одну и ту же аминокислотную последовательность варибельного участка тяжелой цепи (SEQ ID NO: 15) и одну и ту же аминокислотную последовательность варибельного участка легкой цепи (SEQ ID NO: 16). AGEN2034w и AGEN2047w разделяют одну и ту же аминокислотную последовательность варибельного участка тяжелой цепи (SEQ ID NO: 17) и одну и ту же аминокислотную последовательность варибельного участка легкой цепи (SEQ ID NO: 16). AGEN2033w и AGEN2034w являются человеческими антителами IgG₄, содержащими мутацию S228P (т.е., замену серина на пролин в позиции 228 относительно константного участка IgG₄ дикого типа), согласно нумерации системы EU, в то время как AGEN2046w и AGEN2047w являются человеческими антителами IgG1. Кроме того, также характеризуются три мутанта Fc AGEN2047w: мутант N297A, двойной мутант S267E/L328F и тройной мутант S239D/A330L/I332E, с нумерацией согласно нумерации системы EU.

6.1.1. Антитела, связывающиеся с PD-1, экспрессированным активированными Т-клетками

Анти-PD-1 антитела AGEN2046w, AGEN2047w и AGEN2034w проверяют на связывание с активированными мононуклеарными клетками периферической крови (PBMCs) методом проточной цитометрии. Криоконсервированные человеческие PBMC, полученные из неочищенных лейкоцитарных пленок (Research Blood Components, каталожный номер (кат. № 002), или криоконсервированные PBMC яванского макака (Worldwide Primates Inc., по заказу) высевает при 10⁵ клеток/лунка в среде RPMI1640 с добавлением нормоцина™ (InvivoGen, кат. № ant-nr-1) и 10% инактивированной нагреванием FBS (Gibco, кат. № 16140063) в 96-луночные планшеты с поверхностью NUNCCLON delta (NUNC™). Клетки культивируют в присутствии 100 нг/мл стафилококкового энтеротоксина А (SEA; для человеческих PBMC) (Toxin Technologies, кат. № at101red) или стафилококкового энтеротоксина В (SEB; для PBMC яванского макака) (Toxin Technology, кат. № bt202red) в течение 5 суток при 37°C, 5% CO₂ и влажности 97%. Затем клетки промывают один раз буфером для образца (PBS+2% FBS+0,09% азида натрия) и инкубируют в темноте на льду со 100 мкл серийно разведенных антител или изотипических контролей (10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 и 0,0001 мкг/мл AGEN2046w, AGEN2047w или изотипического контрольного человеческого IgG₁ (LifeTein LLC, кат. № LT12031); или 25, 5, 1, 0,2, 0,04, 0,008, 0,0016, 0,00032 и 0,000064 мкг/мл AGEN2034w или изотипического контрольного человеческого IgG₄ (LifeTein LLC, кат. № LT12034)). Через 45 мин клетки дважды промывают буфером для образца и затем инкубируют с красителем для мертвых клеток LIVE/DEAD® Fixable Near-IR (Life Technologies, кат. N L10119), CD4-BV421 (Biolegend, кат. 1 317434) и козьим F(ab')₂ античеловеческим IgG+A+M, R-PE (Life Technologies, кат. 1 АНН707) в течение 30 мин. Клетки дважды промывают буфером для образца и затем ресуспендируют в буфере для образца и анализируют с помощью цитометра FACS Fortessa (Becton Dickinson). CD4+ Т-клетки задерживают, и регистрируют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI).

Анти-PD-1 антитела AGEN2046w и AGEN2047w связывают с активированными человеческими CD4+ Т-клетками (фиг. 1A). AGEN2034w связывают с активированными CD4+ Т-клетками человека и яванского макака (фиг. 1B и 1C).

Связывание AGEN2034w с активированными первичными человеческими Т-клетками измеряют снова в подобном анализе. Коротко, человеческие PBMC культивируют в присутствии 100 нг/мл пептида SEA в течение 5 суток и затем окрашивают серийно разведенным (50, 10, 2, 0,4, 0,080, 0,016, 0,0032, 0,00064, 0,000128, 0,0000256, 0,00000512 и 0,000001024 мкг/мл) AGEN2034w или изотипическим контрольным человеческим IgG₄. Клетки анализируют с помощью цитометра FACS Fortessa (Becton Dickinson). CD4+ Т-клетки задерживают, и регистрируют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI).

Как видно на фиг. 1D, AGEN2034w связывается с активированными первичными человеческими CD4+ Т-клетками.

6.1.2. Анализ на селективность антитела против PD-1

Селективность AGEN2034w в отношении PD-1 оценивают против гомологичных белков с использованием технологии "suspension array".

На основании гомологии их аминокислотных последовательностей с PD-1, отбирают белки суперсемейства Ig кольцевой гомолог 2 (ROBO2), B7 гомолог 7 (B7-H7) и сигнальный регуляторный белок гамма (SIRPyu) для оценки связывания AGEN2034w с использованием технологии "suspension array". ROBO2, B7-H7 и SIRPy идентифицируют как гомологи PD-1, выравнивая белки с применением средства поиска Basic Local Alignment (BLAST; NCBI). Гомология последовательностей человеческого PD-1 с его

гомологами следующая: человеческого PD-1 против (vs) человеческого ROBO2: 27,9%; человеческого PD-1 vs человеческого SIRPγ (SIRPG_HUMAN): 24,8%; и человеческого PD-1 vs человеческого B7-H7: 22,6%.

Рекомбинантные белки химера человеческий ROBO2-Fc (R&D Systems, кат. № 3147-RB-050), химера человеческий B7-H7-Fc (R&D Systems, кат. № 8084-B7-050), химера человеческий SIRPγ-His (Sino Biologicals, кат. № 11828-H08H) и химера человеческий PD-1-Fc (R&D Systems, кат. № 1086-PD) вводят в сочетание с микросферами Luminex® (Luminex Corp., кат. № LC10005-01, LC10022-01, LC10046-01, LC10048-01 и LC10059-01) с использованием химии сложных эфиров N-гидроксисукцинимид (NHS) и инкубируют с титрованием дозы (7,5, 2,5, 0,833, 0,277, 0,0926, 0,0309, 0,0103, 0,0034, 0,0011, 0,0004, 0,0001 и 0,00004 мкг/мл) AGEN2 034w. Затем для детекции AGEN2 034w добавляют антитело античеловеческий IgG, меченный фикоэритрином (PE). Связывание оценивают с помощью системы детекции Luminex® 200.

Антитело AGEN2034w показывает специфическое связывание с человеческим PD-1 и в испытываемых концентрациях не обнаруживают существенного связывания с ROBO2, B7-H7 или SIRPγ (фиг. 2).

6.1.3. Лигандблокирующая активность, определенная с помощью технологии "suspension array"

Для того, чтобы определить, блокируют ли анти-PD-1 антитела связывание лигандов PD-11 и PD-12, проводят вышеописанный анализ с использованием технологии suspension array. В каждую лунку на половине площади 96-луночных планшетов (Corning, Inc., кат. № 3884) добавляют 1200 гранул Luminex® в 5 мкл буфера для анализа (Luminex Corp, кат. № 48 LC10014-48). Гранулы соединяют с химерой антигена PD-1 PD-1-Fc (R&D Systems, кат. № 1086-PD) через аминокислотное сочетание с COOH на поверхности гранул. Реакцию сочетания выполняют с использованием 50 мкг/мл антигена PD-1 и 1×10^7 гранул Luminex на мл. Используют стандартную химию сложных эфиров NHS для образования карбодиимидных связей между первичными аминогруппами антигена и карбоксильными группами на поверхности гранул (Luminex Xmap cookbook, chapter 3).

Сочетание антигена с белками является простой двухстадийной процедурой для образования карбодиимидных связей, во время которой карбоксильные группы микросфер сначала активируются реагентом EDC (гидрохлорид 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимида) в присутствии сульфо-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид) с образованием промежуточного сложного сульфо-NHS-эфира. Затем реакционноспособное промежуточное соединение восстанавливают путем взаимодействия с первичным амином молекулы-мишени (антитела, белка или пептида) с образованием ковалентной амидной связи. Гранулы для сочетания инкубируют с различными концентрациями анти-PD-1 антител при трехкратном повторе (конечные концентрации от 7,5 до 0,01 мкг/мл на лунку) в течение 1 ч при 20°C и 650 об/мин. Испытываемыми антителами являются AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w и AGEN2047w, изотипический контроль IgG1 и изотипический контроль IgG4. Затем в каждую лунку добавляют 30 мкл меченного R-PE PD-L1-Fc (системы R&D, кат. № 156-B7) или PD-L2-Fc (системы R&D, кат. № 1224-PL) в концентрации 1 нМ, получая общий объем в лунке 60 мкл (1200 гранул на лунку и конечная концентрация 0,5 нМ меченного PD-11 или PD-12). Мечение лиганда проводят с использованием наборов для мечения R-PE (AbDSerotec, LYNX Rapid RPE Antibody Conjugation Kit, кат. № LNK023RPE) согласно протоколу изготовителя. Планшеты анализируют с использованием системы Luminex® 200 (Millipore). Насчитывают 100 гранул на лунку в образце 50 мкл. Лигандблокирующий потенциал вычисляют с использованием величин MFI неконкурирующего сигнала (100% связывание) только контрольного лиганда. Детектируемый сигнал PE показывает связывание лиганда с антигеном.

Все испытываемые анти-PD-1 антитела ингибируют связывание PD-11 и PD-12 с PD-1 (фиг. 3A-3D).

Измерение лигандблокирующей активности AGEN2034w повторяют в подобном анализе. Коротко, рекомбинантную химеру PD-1-Fc (R&D Systems, кат. № 1086-PD) сочетают с микросферами Luminex® (Luminex Corp, Кат. № LC10048-01) с использованием химии сложных эфиров N-гидроксисукцинимид (NHS). Гранулы с присоединенным PD-1 инкубируют с титрованием дозы ($4,0 \times 10^{-5}$ –7, 5 мкг/мл) AGEN2034w или изотипического контрольного антитела с последующей инкубацией флуоресцентно меченного PD-L1-Fc (R&D Systems, кат. № 156-B7) или PD-L2-Fc (R&D Systems, кат. № 1224-PL). Затем оценивают связывание PD-11 или PD-12 с гранулами с присоединенным PD-1 с использованием системы детекции Luminex® 200, и регистрируют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI).

Антитело AGEN2034w эффективно блокирует сцепление PD-1 с его лигандами PD-11 (фиг. 3E) и PD-12 (фиг. 3F).

6.1.4. Действие анти-PD-1 антител на человеческие PBMC после стимуляции стафилококковым энтеротоксином A (SEA)

Функциональную активность анти-PD-1 антител на первичных человеческих Т-клетках оценивают с использованием стимуляции SEA. Криоконсервированные человеческие PBMC, полученные из неочищенных лейкоцитных пленок (Research Blood Components, кат. № 002), высевают при 10^5 клетки/лунка в среде RPMI1640 с добавлением нормоцина™ (InvivoGen, кат. № ant-nr-1) и 10% инактивированной сывороткой FBS (Gibco, кат. № 16140063) в 96-луночные планшеты с поверхностью NUNC LON delta

(NUNC™). Клетки культивируют в присутствии фиксированной концентрации (10 мкг/мл) или дозовых количеств антител (50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0,016 и 0,0032 мкг/мл) и фиксированного количества SEA (100 нг/мл, Toxin Technology, кат. № at101red) в течение 5 суток при 37°C, 5% CO₂ и влажности 97%. Испытываемыми антителами являются AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w и изотипический контроль IgG₁. Супернатант собирают и хранят при -80°C до анализа. Титры IL-2 измеряют методом электрохемилюминесценции (MSD).

Как видно на фиг. 4А и 4В, анти-PD-1 антитела AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w и AGEN2047w повышают продуцирование IL-2 PBMC относительно изотипического контроля при наличии стимуляции SEA.

Далее, проверяют антагонистическую активность AGEN2034w или одного или в комбинации с анти-CTLA-4, анти-TIGIT, анти-CD137 или анти-OX40 антителами в анализе первичных PBMC, описанном выше. Коротко, криоконсервированные человеческие PBMC, полученные из неочищенных лейкоцитных пленок (Research Blood Components, кат. № 002), культивируют с суперантигеном SEA (Toxin Technology, кат. № at101red) (100 нг/мл на фиг. 4С, 4D и 4F; 200 нг/мл на фиг. 4Е) и AGEN2034w (10 мкг/мл на фиг. 4С и 4Е; 5 мкг/мл на фиг. 4D; интервал дозы 12, 6, 3, 0,3, 0,03, 0,003, 0,0003 и 0,0001 мкг/мл на фиг. 4F) или изотипическим контрольным антителом в присутствии 5 мкг/мл анти-CTLA-4 антитела ипилимумаба (Myoderm) (фиг. 4С), 10 мкг/мл анти-TIGIT антитела rab2197 или rab2196 (фиг. D 4), 5 мкг/мл анти-CD137 антитела rab2225 (фиг. 4Е) или интервала дозы (12, 6, 3, 0,3, 0,03, 0,003, 0,0003 и 0,0001 мкг/мл) анти-OX40 антитела rab1928 в течение 5 суток. Супернатанты собирают, и измеряют титры IL-2 с использованием AlphaLISA (Perkin Elmer, кат. № AL221C). Анти-TIGIT антитела rab2197 и rab2196 получают на основе последовательностей варибельного участка антител 10A7 и 1F4, соответственно, описанных в публикации заявки на патент США № US 2013/0251720 (полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки). анти-CD137 антитело rab2225 получают на основе последовательностей варибельного участка антитела 20H4, описанного в патенте США № 8137667 (полностью включенном в настоящее описание в качестве ссылки). Анти-OX40 антитело rab1928 получают на основе последовательностей варибельного участка антитела Hu106-122, описанного в публикации заявки на патент США № US 2013/0280275 (полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки). Последовательности анти-TIGIT, анти-CD137 и анти-OX40 антител приводятся в табл. 8.

Таблица 8. Последовательности анти-TIGIT, анти-CD137 и анти-OX40 антител

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
66	pab2197, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFTFSSFTMHWVRQSPGK GLEWVAFIRSGSGIVFYADAVRGRFTISRDNAKNLLFLQMNDL KSEDTAMYYCARRPLGHNTFDSWGQGTLLTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG
67	pab2197, легкая цепь	DIVMTQSPSSSLAVSPGEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQ QKPGQSPKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQA EDMGQYFCQQGINNPLTFGDGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
68	pab2196 тяжелая цепь	EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLMNWVKQSHGK NLEWIGLIIPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSL TSDDSAVYFCRGLRGFYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG

69	pab2196 легкая цепь	DVVLQTQPLSLSVSFGDQVSI SCRSSQSLVNSYGN TFLSWYLH KPGQSPQLLIFGISNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPE DLGMYCYCLQGT HQPPTFGPGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
70	pab2225 тяжелая цепь	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPEK GLEWIGEINHGGYVTYNPSLESRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARDYGP GNYDWFYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
71	pab2225 легкая цепь	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVY YCQQRSNWPPALTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
72	pab1928 тяжелая цепь	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYSMHWRQAPGQ GLKWMGWINTETGEPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSL KAEDTAVYYCANPYDYVVSYYAMDYWGQGT TTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
73	pab1928 легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASYLYTGVP SRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATY YCQQHYSTPRTFGQGTKEIKRSVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS YSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Анти-PD-1 антитело AGEN2034w, или одно или в комбинации с анти-CTLA-4 антителом или имму-
мабом (фиг. 4C), анти-TIGIT антителом pab2197 или pab2196 (фиг. 4D), анти-CD137 антителом pab2225
(фиг. 4E) или анти-OX40 антителом pab1928 (фиг. 4F), усиливает продуцирование IL-2 в человеческих
PBMC в присутствии суперантигена SEA.

6.1.5. Влияние связывания Fc-рецептора на антагонистическую активность анти-PD-1 антител

В этом примере проверяют влияние связывания FcγR на антагонистическую активность анти-PD-1
антител.

Сначала проверяют антагонистическую активность эталонного анти-PD-1 антитела в присутствии
или в отсутствие блокаторов FcγR. Криоконсервированные человеческие PBMC, полученные из неочи-
щенных лейкоцитных пленок (Research Blood Components, кат. № 002), высевают при 10⁵ клетки/лунка в
среде RPMI1640 с добавлением нормоцина™ (InvivoGen, кат. № ant-nr-1) и 10% инактивированной на-
греванием FBS (Gibco, кат. № 16140063) в 96-луночные планшеты с поверхностью NUNCCLON delta
(NUNC™). Клетки культивируют со 100 нг/мл пептида SEA (Toxin Technology, кат. № at101red) и 10
мкг/мл эталонного анти-PD-1 антитела или изотипического контроля в присутствии или в отсутствие
фиксированной концентрации блокирующего Fc-рецептор коктейля, содержащего анти-CD16 антитело
(1 мкг/мл, системы R&D, кат. № AF1330) и иррелевантный IgG1 (25 мкг/мл, LifeTein, кат. № LT12031), в
течение 5 суток при 37°C, 5% CO₂ и влажности 97%. Супернатанты собирают и хранят при -80°C до ана-

лиза. Титры IL-2 измеряют методом электрохемилюминесценции (MSD).

Блокада FcγR с использованием анти-CD16 антитела усиливает способность эталонного анти-PD-1 антитела индуцировать секрецию IL-2 в таком анализе первичных человеческих PBMC (фиг. 5A).

Подобное исследование проводят для проверки влияния блокады FcγR на антагонистическую активность AGEN2034w. Коротко, человеческие PBMC культивируют со 100 нг/мл пептида SEA (Toxin Technology, кат. № at101red), 10 мкг/мл AGEN2034w или изотипическим контрольным антителом (HEL IgG1, LifeTein, кат. № LT12031), и 20 мкг/мл анти-CD16 антитела (Biolegend, кат. № 302013), анти-CD32 антитела (eBioscience, кат. № 16-0329-81), которое связывается как с CD32A, так и с CD32B, анти-CD64 антитела (Biolegend, кат. № 305016) или изотипического контроля (Biolegend, кат. № 400543) в течение 5 суток при 37°C, 5% CO₂ и влажности 97%. Супернатанты собирают и хранят при -80°C до анализа. Титры IL-2 измеряют методом электрохемилюминесценции (MSD).

В соответствии с результатом на фиг. 5A, блокада FcγR с использованием анти-CD16 антитела, анти-CD32 антитела или анти-CD64 антитела повышает секрецию IL-2, вызванную AGEN2034w, в таком анализе первичных человеческих PBMC (фиг. 5B).

Далее получают три мутанта Fc IgG₁ AGEN2047w (мутант N297A, двойной мутант S267E/L328F и тройной мутант S239D/A330L/I332E, с нумерацией согласно нумерации системы EU) и сравнивают против AGEN2047w, которое включает константный участок IgG1 дикого типа, в анализе человеческих PBMC с SEA, описанном выше. Коротко, криоконсервированные человеческие PBMC инкубируют со 100 нг/мл SEA и 10 мкг/мл анти-PD-1 антител AGEN2047w, AGEN2047w-N297A, AGEN2047w-S267E/L328F, AGEN2047w-S239D/A330L/I332E или изотипических контрольных антител с соответствующими Fc участками дикого типа или мутантными.

Как видно на фиг. 5C, мутант N297A с пониженным связыванием FcγR дополнительно усиливает секрецию IL-2. Напротив, двойной мутант S267E/L328F и тройной мутант S239D/A330L/I332E, которые оба имеют усиленное связывание FcγR, индуцируют меньшее продуцирование IL-2, чем индуцирует AGEN2047w дикого типа.

6.1.6. Влияние анти-PD-1 антитела на реакцию в смешанной культуре лимфоцитов

Далее анти-PD-1 антитело AGEN2034w проверяют в реакции в смешанной культуре лимфоцитов. Дендритные клетки, полученные из изолированных CD14⁺ клеток (Stemcell Technologies, кат. № 18058), полученных из криоконсервированных HLA-A2⁺ человеческих PBMC и дифференцированных сначала в присутствии 500 Е/мл IL-4 (Peprotech, кат. № 200-04-20UG) и 1000 Е/мл GM-CSF (Peprotech, кат. № 300-03-20UG) в течение 24 ч и затем в присутствии 1000 Е/мл TNFα (Peprotech, кат. № 300-01A-50UG), 10 нг/мл IL-1β (Peprotech, кат. № 200-01B-10UG), 10 нг/мл IL-6 (Peprotech, кат. № 200-06-20UG) и 1 мкМ PGE2 (Sigma, кат. № P0409-5MG) в течение еще 24 ч. Отобранные 50000 Т-клеток, очищенных от аллогенного донора HLA-A2 человеческих PBMC очисткой на колонке MACS (Miltenyi Biotec, кат. № 130-096-535), культивируют совместно с 10000 дендритных клеток в отсутствие какого-либо антитела или в присутствии 10 мкг/мл изотипического контрольного антитела человеческого IgG₄ (Biolegend, кат. № 403402) или 10 мкг/мл AGEN2034w в RPMI (Corning, кат. № 10-040-CM), содержащей 5% человеческой сыворотки АВ (Corning, кат. № 35-060-CI) и пенициллин/стрептомицин (Gibco, кат. № 15140-122). Культуры инкубируют в течение 5 суток при 37°C и 5% CO₂. Супернатанты оценивают на стационарные концентрации IFNγ с использованием AlphaLISA (Perkin Elmer, кат. № AL217C).

Как видно на фиг. 6, AGEN2034w индуцирует продуцирование IFNγ в совместной культуре очищенных человеческих Т-клеток и полученных *in vitro* аллогенных дендритных клеток.

6.1.7. Действие анти-PD-1 антитела в анализе на супрессию асцитических жидкостей

В этом примере анти-PD-1 антитело AGEN2034w проверяют на его способность ослаблять супрессию пролиферации Т-клеток, вызванную асцитической жидкостью при раке яичников. Коротко, первичные человеческие PBMC метят CFSE (Biolegend, кат. № 423801) и затем стимулируют 1 мкг/мл анти-CD3 антитела (eBioscience, кат. № 16-0037-85) и 50%, объем/объем, асцитической жидкостью при раке яичников в присутствии возрастающих концентраций (0,0000102-50 мкг/мл) AGEN2034w или изотипического контрольного антитела IgG₄ (Biolegend, кат. № 317434) в течение 4-5 суток. Клетки окрашивают иммунно античеловеческим CD4 антителом (Biolegend, кат. № 317434) или античеловеческим CD8 антителом (Biolegend, кат. № 344710) и красителем для определения жизнеспособности LIVE-DEAD (Life Technologies, кат. № L10119). Проллиферацию CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток, как иллюстрирует разведение CFSE, измеряют проточной цитометрией с использованием BD Fortessa (Becton Dickinson).

Как видно на фиг. 7A-7C, совместное культивирование с асцитической жидкостью при раке яичников снижает пролиферацию стимулированных анти-CD3 антителом Т-клеток, и такое снижение может быть частично ослаблено анти-PD-1 антителом AGEN2034w.

6.1.8. Действие анти-PD-1 антитела в репортерном анализе клеток Юрката NFAT-люциферазы

Кроме того, репортерный анализ используют для зондирования антагонистической активности AGEN2034w. Конкретно, в таком репортерном анализе совместная культура PD-11-экспрессирующих клеток-мишеней и PD-1-экспрессирующих репортерных клеток ингибирует экспрессию NFAT-люциферазного репортерного гена в репортерных клетках. Блокада взаимодействия PD-1/PD-11 анти-PD-

1 антителом может ослабить сигнал ингибирования, что ведет к экспрессии люциферазы.

Коротко, PD-11+ CHOK1 клетки-мишени (Promega, кат. № CS187108) культивируют совместно с GloResponse™ NFAT-luc2/PD-1 репортерные клетки Юрката (Promega, кат. № CS187102) в присутствии возрастающих концентраций (0-50 мкг/мл) AGEN2034w или изотипического контрольного антитела в среде RPMI-1640 (Corning, кат. № 21-040-CV) с добавлением 2% инактивированной нагреванием FBS (Gemini, кат. № 100-106). После 6 ч инкубации определяют эффективность AGEN2034w в ослаблении супрессии репортерного гена, индуцированной связыванием PD-11 с PD-1, определяя люциферазу с использованием системы анализа люциферазы Bio-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, кат. 1 G7941).

Как видно на фиг. 8, анти-PD-1 антитело AGEN2034w усиливает передачу сигнала TCR в зависимости от дозы в таком репортерном анализе Юрката-NEAT-люцифераза.

6.2. Пример 2. Характеризация дополнительных анти-PD-1 антител

В этом примере характеризуют следующие шесть дополнительных анти-PD-1 антител: AGEN2001w, AGEN2002w, EP11_pl1_B03, EP11_pl1_B05, EP11_pl1_C02 и EP11_pl1_C03. Последовательности вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цеп этих антител раскрыты в табл. 6.

6.2.1. Анализ анти-PD-1 антител на связывание и блокаду лиганда

Аффинность шести анти-PD-1 антител, описанных выше, анализируют поверхностным плазмонным резонансом. Все шесть антител связываются с рекомбинантным человеческим PD-1 (данные не приводятся).

Активность блокирования лигандов шести анти-PD-1 антител проверяют с использованием технологии "suspension array" в анализе, схожем с анализом, описанным в разделе 6.1.3. Объединенные гранулы инкубируют с различными концентрациями анти-PD-1 антител при двукратном повторе (конечные концентрации от 7,5 до 0,001 мкг/мл на лунку) в течение 1 ч при 20°C и 650 об/мин. Затем добавляют меченный R-PE PD-L1-Fc (R&D Systems, кат. № 156-B7) или PD-12-Fc (R&D Systems, кат. № 1224-PL). Испытываемыми анти-PD-1 антителами являются AGEN2001w, AGEN2002w, EP11_pl1_B03, EP11_pl1_B05, EP11_pl1_C02 и EP11_pl1_C03. Как видно на фиг. 9A-9F, все испытываемые анти-PD-1 антитела блокируют связывание PD-1 с PD-11 и PD-12 в зависимости от дозы.

6.2.3. Влияние анти-PD-1 антител на человеческие PBMC после стимуляции стафилококковым энтеротоксином А (SEF)

Функциональную активность анти-PD-1 антитела AGEN2002w на человеческих PBMC проверяют в анализе, схожем с анализом, описанным в разделе 6.1.4. Коротко, криоконсервированные человеческие PBMC, полученные из неочищенных лейкоцитарных пленок (Research Blood Components, кат. № 002), культивируют в присутствии 10 мкг/мл анти-PD-1 антитела AGEN2002w или изотипического контрольного антитела (HEL IgG₁, LifeTein, кат. № LT12031) и 100 нг/мл пептида SEA (Toxin Technologies, кат. № at101red) в течение 4 суток при 37°C, 5% CO₂ и влажности 97%. Супернатанты собирают и хранят при -80°C до анализа. Титры IL-2 измеряют методом электрохемилюминесценции (MSD).

Как видно на фиг. 10, анти-PD-1 антитело AGEN2002w повышает продуцирование IL-2 первичными человеческими PBMC при наличии стимуляции SEA.

6.3. Пример 3. Картирование эпитопа анти-PD-1 антитела

Эпитоп анти-PD-1 антитела AGEN2034w характеризуют с использованием масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX) и анализа Pepscan.

6.3.1. Картирование эпитопа анти-PD-1 Fab с использованием масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX)

Взаимодействие фрагмента Fab AGEN2034w (AGEN2034w-Fab) с внеклеточным доменом человеческого PD-1 исследуют масс-спектрометрией водородно-дейтериевого обмена (HDX).

Рекомбинантный меченный His человеческий PD-1 получают от Sino Biological Inc (Cat# 10377-H08H). При использовании дегликозилированного PD-1 его получают из 300 мкг рекомбинантного меченного His белка человеческого PD-1 инкубацией с 6 мкл PNGазы F при 37°C в течение 4 ч. Фрагмент Fab анти-PD-1 антитела получают из AGEN2034w путем обработки протеазой.

Для расщепления пепсином/протеазой XVIII 4,0 мкг нативного или дегликозилированного человеческого PD-1 в 125 мкл буфера для контроля (50 мМ фосфата, 100 мМ хлорида натрия при pH 7,4) денатурируют, добавляя 135 мкл 4 М гидрохлорида гуанидина, 0,85 М буфера TCEP (конечный pH составляет 2,5) и инкубируют смесь в течение 3 мин при 11°C. Затем смесь подвергают расщеплению на колонке с пепсином/протеазой XVIII, используя колонку, набитую пепсином/протеазой XVIII на месте, и полученные пептиды анализируют с использованием системы СВЭЖХ-МС, состоящей из СВЭЖХ Waters Acquity в сочетании с квадрупольным с орбитальной ловушкой масс-спектрометром Q Exactive™ Hybrid (Thermo). Пептиды разделяют на колонке 50 мм × 1 мм, C8, с 19-мин градиентом 2-27% растворителя В (0,2% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Идентификацию пептидов осуществляют через поиск данных МС/МС против последовательности человеческого PD-1 с помощью Mascot. Допуск по массе для ионов предшественника и продукта составляет 10 ч/млн и 0,05 Да, соответственно.

Инкубируют 10 мкл человеческого PD-1 (4,0 мкг) или 10 мкл смеси человеческого PD-1 и Fab (4,0 мкг, 4,0 мкг) со 125 мкл буфера для мечения оксидом дейтерия (50 мМ фосфата натрия, 100 мМ хлорида

натрия при рD 7,4) в течение 0, 60, 600 и 3600 с при 11°C. Обмен водород/дейтерий гасят, добавляя 135 мкл раствора 4 М гидрохлорида гуанидина, 0,85 М буфера TCEP (конечный pH составляет 2,5). Затем погашенные образцы подвергают расщеплению на колонке с пепсином/протеазой XVIII и анализу ЖХ-МС, описанным выше. Масс-спектры регистрируют только в режиме МС.

Необработанные данные МС обрабатывают с использованием программы HDX WorkBench для анализа данных МС обмена H/D (J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2012, 23 (9), 1512-1521, включена полностью в настоящее описание в качестве ссылки). Уровни дейтерия вычисляют с использованием среднего различия в массе между дейтерированным пептидом и его нативной формой (to).

Покровительство последовательности 85,4% достигают для дегликозилированного человеческого PD-1 без метки His. Большинство пептидов PD-1 отображает идентичные или схожие уровни дейтерия в присутствии и в отсутствие Fab против человеческого PD-1. Однако обнаружено, что некоторые пептидные сегменты имеют существенно сниженные уровни включения дейтерия после связывания Fab. Все остатки в этом абзаце нумерованы согласно SEQ ID NO: 74. Дегликозилированный человеческий PD-1 показывает сильное снижение поглощения дейтерия после связывания с Fab против человеческого PD-1 в остатках 107-122 (SLAPKAQIKESLRAEL) (SEQ ID NO: 75). Кроме того, снижение поглощения дейтерия после связывания с Fab против человеческого PD-1 можно наблюдать в остатках 5-22 (LDSPDRPWNPPTFSPALL) (SEQ ID NO: 76).

6.3.2. Картирование эпитопа анти-PD-1 антитела с использованием анализа Pepscan

Связывание анти-PD-1 антитела AGEN2034w измеряют против фрагментов синтезированного пептида PD-1, полученных в виде пептидной матрицы, связанной с чипом. Анализ выполняют в Pepscan Presto BV, Lelystad, Нидерланды. Коротко, для реконструкции эпитопов человеческого PD-1 синтезируют библиотеку пептидов. Носитель аминокислотизированный полипропилен получают прививкой патентованного препарата гидрофильного полимера с последующим взаимодействием с трет-бутоксикарбонилгексаметилендиамином (BocHMDA), используя дициклогексилкарбодиимид (DCC) с N-гидроксисукцинимидом (HOBt), и затем отщеплением Boc-групп с использованием трифторуксусной кислоты (ТФК). Используют стандартный Fmoc-пептидный синтез для синтеза пептидов на аминокислотизированном твердом носителе с помощью модифицированной по заказу жидкости JANUS, управляющей расположением (Perkin Elmer). Синтез структурных миметиков проводят с использованием патентованной технологии химически связанных пептидов на каркасах (CLIPS) Pepscan. Технология CLIPS позволяет пептидам структурироваться в одинарные петли, двойные петли, тройные петли, листообразные складки, спиралеобразные складки и их комбинации. Связывание антитела с каждым из синтезированных пептидов проверяют в ELISA на основе PEPSCAN. Пептидные матрицы инкубируют с раствором первичного антитела в течение ночи при 4°C. После промывки пептидные матрицы инкубируют с конъюгатом козьего античеловеческого HRP (Southern Biotech, кат. № 2010-05) в течение 1 ч при 25°C. После промывки добавляют пероксидазный субстрат сульфат 2,2'-азиноди-3-этилбензтиазолина (ABTS) и 20 мкл/мл 3% H₂O₂. Спустя 1 ч отмечают проявление окраски и определяют количественно с помощью прибора с зарядовой связью (CCD) -камеры и системы обработки изображения.

Исследование Pepscan показывает, что анти-PD-1 антитело AGEN2034w узнает отрезки человеческого PD-1, включая остатки 6-15 (DSPDRPWNP) (SEQ ID NO: 77), остатки 130-138 (EVPTAHPSP) (SEQ ID NO: 78) и остатки 106-113 (ISLAPKAQ) (SEQ ID NO: 79), нумерованные согласно SEQ ID NO: 74.

Изобретение по объему не ограничивается конкретными воплощениями, описанными в настоящем описании. В действительности различные модификации изобретения, кроме описанных, станут очевидными для специалистов в данной области техники из приведенного выше описания и сопровождающих фигур. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Все ссылки (например, публикации или патенты или заявки на патент), цитированные в настоящем описании, полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок и для всех целей в такой степени, как если бы каждая отдельная ссылка (например, публикация или патент или заявка на патент) была конкретно и отдельно указана как включенная полностью в качестве ссылки для всех целей. Другие воплощения находятся в рамках следующей далее формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1 человека, содержащее вариативный участок тяжелой цепи, содержащий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариативный участок легкой цепи, содержащий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:

(a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SYGMH (SEQ ID NO: 1);

(b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID NO: 32), где

X₁ является Y или F;

X₂ является K или E и

- X_3 является К или М;
 (с) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность NX_1X_2 (SEQ ID NO: 33), где X_1 является G или V и X_2 является Н или Y;
 (d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4);
 (e) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 5) и
 (f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).
2. Конъюгат антитела, содержащий выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1 человека, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:
- (a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SYGMH (SEQ ID NO: 1);
 (b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID NO: 32), где
 X_1 является Y или F;
 X_2 является К или Е и
 X_3 является К или М;
 (с) CDRH3 включает аминокислотную последовательность NX_1DX_2 (SEQ ID NO: 33), где X_1 является G или V и X_2 является Н или Y;
 (d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4);
 (e) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 5) и
 (f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6), где выделенное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством, цитостатическим средством или токсином.
3. Выделенное антитело по п.1 или конъюгат антитела по п.2, где:
- (a) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 34-36;
 (b) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 7 и 37 и/или
 (с) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 с SEQ ID NO: 1, 2 и 3; 1, 2 и 7; 1, 2 и 37; 1, 34 и 7; 1, 35 и 7 или 1, 36 и 7 соответственно.
4. Выделенное антитело по п.1 или конъюгат антитела по п.2, где:
- (a) CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6 соответственно или
 (b) CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 7, 4, 5 и 6 соответственно.
5. Выделенное антитело или конъюгат антитела по любому из пп.1-4, где антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.
6. Выделенное антитело или конъюгат антитела по любому из пп.1-4, где антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85, 90, 95 или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31.
7. Выделенное антитело или конъюгат антитела по любому из пп.1-6, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55 или 56.
8. Выделенное антитело или конъюгат антитела по любому из пп.1-6, где антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, полученной из зародышевой последовательности IGHV3-33 человека, и/или вариабельный участок легкой цепи с аминокислотной последовательностью, полученной из зародышевой последовательности IGKV3-15 человека.
9. Выделенное антитело или конъюгат антитела по любому из пп.1-8, где антитело содержит вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85, 90, 95 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16.
10. Выделенное антитело или конъюгат антитела по любому из пп.1-9, где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.
11. Выделенное антитело по п.1 или конъюгат антитела по п.2, где вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, соответственно, содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и 16; 17 и 16; 26 и 16; 27 и 16; 28 и 16; 29 и 16; 30 и 16 или 31 и 16.
12. Выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1 человека, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, где аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно, содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и 16, 17 и 16, 52 и 19, 53 и 19, 54 и 19, 55 и 19 или 56 и 19.
13. Выделенное антитело по п.11, где антитело содержит:
- (a) вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID

NO: 17, и

(b) вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

14. Выделенное антитело по п.12, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

15. Выделенное антитело по п.14, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

16. Выделенное антитело или конъюгат антитела по любому из пп.1-15, где:

(a) антитело связывается с эпитопом, состоящим из остатков 107-122 SEQ ID NO: 74;

(b) антитело связывается с эпитопом, состоящим из остатков 5-22 SEQ ID NO: 74;

(c) антитело связывается с эпитопом, состоящим из остатков 6-15 SEQ ID NO: 74;

(d) антитело связывается с эпитопом, состоящим из остатков 130-138 SEQ ID NO: 74; или

(e) антитело связывается с эпитопом, состоящим из остатков 106-113 SEQ ID NO: 74.

17. Выделенное антитело или конъюгат антитела по любому из пп.1-6, 11 или 13, где антитело содержит константный участок тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂ человека и/или константный участок легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из легкой капша цепи человека и легкой лямбда цепи человека.

18. Выделенное антитело или конъюгат антитела по любому из пп.1-6, 11 или 13, где:

(a) антитело содержит константный участок тяжелой цепи IgG₁ человека, который лишен гликановой группы в положении N297 согласно системе нумерации EU;

(b) антитело содержит константный участок тяжелой цепи IgG₁ человека, содержащий мутацию N297A согласно системе нумерации EU;

(c) антитело содержит константный участок тяжелой цепи IgG₁ человека, содержащий мутацию N297Q согласно системе нумерации EU;

(d) антитело содержит константный участок тяжелой цепи IgG₁ человека, содержащий мутацию D265A согласно системе нумерации EU; и/или

(e) антитело содержит константный участок тяжелой цепи IgG₄ человека, содержащий мутацию S228P согласно системе нумерации EU.

19. Выделенное антитело или конъюгат антитела по любому из пп.1-6, 11 или 13, где антитело содержит константный участок тяжелой цепи IgG человека, который является вариантом константного участка тяжелой цепи IgG дикого типа человека, где вариант константного участка тяжелой цепи IgG человека:

(a) связывается с Fc-рецептором человека с меньшей аффинностью, чем соответствующий константный участок тяжелой цепи IgG дикого типа человека; или

(b) является константным участком тяжелой цепи варианта IgG₁ человека, варианта IgG₂ человека или варианта IgG₄ человека.

20. Выделенное антитело или конъюгат антитела по п.19, где Fc-рецептором человека является FcγR.

21. Выделенное антитело или конъюгат антитела по п.19, где Fc-рецептором человека является FcγRIIB.

22. Выделенное антитело или конъюгат антитела по любому из пп.1-19, где:

(a) антитело является антителом человека;

(b) антитело проявляет антагонизм в отношении PD-1 человека;

(c) антитело дезактивирует, снижает или ингибирует активность PD-1 человека;

(d) антитело ингибирует связывание PD-1 человека с PD-L1 человека или PD-L2 человека;

(e) повышает продукцию IL-2 мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC), стимулированными стафилококковым энтеротоксином A (SEA);

(f) антитело повышает продукцию IFNγ совместной культурой Т-клеток человека и аллогенных дендритных клеток;

(g) антитело повышает пролиферацию стимулированных анти-CD-3-антителом CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток, культивированных вместе с асцитной жидкостью при раке яичников; и/или

(h) антитело усиливает передачу сигнала NFAT-люциферазы репортерными клетками, культивированными вместе с экспрессирующими PD-L1 клетками-мишенями.

23. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или конъюгат антитела по любому из пп.1-22 и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

24. Выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела по любому из пп.1 или 3-22.

25. Выделенный полинуклеотид, кодирующий легкую цепь антитела по любому из пп.1 или 3-22.

26. Выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь антитела по любому из пп.1 или 3-22.

27. Выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи антитела по любому из пп.1 или 3-22.

28. Выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельную область легкой цепи антитела по любому из пп.1 или 3-22.

29. Выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи антитела по любому из пп.1 или 3-22.

30. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по любому из пп.24-29.

31. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по любому из пп.24-29 или вектор по п.30.

32. Способ получения антитела, которое связывается с PD-1, где способ включает культивирование клетки-хозяина содержащей:

(а) полинуклеотид по п.26 или 29;

(б) выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи антитела по любому из пп.1 или 3-22, и выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельную область легкой цепи антитела по любому из пп.1 или 3-22; или

(с) выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела по любому из пп.1 или 3-22, и выделенный полинуклеотид, кодирующий легкую цепь антитела по любому из пп.1 или 3-22,

в условиях, при которых осуществляется экспрессия полинуклеотида и продукция антитела.

33. Способ повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у индивида, включающий введение индивиду эффективного количества антитела, конъюгата антитела или фармацевтической композиции по любому из пп.1-23.

34. Способ лечения рака у индивида, включающий введение индивиду эффективного количества антитела, конъюгата антитела или фармацевтической композиции по любому из пп.1-23, где рак выбран из группы, состоящей из острого лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, рака мочевого пузыря, рака кости, глиомы ствола мозга, рака молочной железы, рака надпочечников, рака эндокринной системы, рака почек или уретры, рака парашитовидной железы, рака тонкой кишки, рака щитовидной железы, рака уретры, рака ануса, рака ротоглотки, рака пениса, рака прямой кишки, рака влагалища, рака вульвы, злокачественных заболеваний, при которых экспрессируется PD-L1, карциномы шейки матки, карциномы эндометрия, карциномы фаллопиевых труб, карциномы почечной лоханки, рака шейки матки, хронического лейкоза, хронического лимфолейкоза, хронического миелоидного лейкоза, колоректального рака, рака эндометрия, рака, вызванного воздействием окружающей среды, включая рак, вызванный асбестом, плоскоклеточного рака, рака пищевода, мультиформной глиобластомы, глиомы, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярного рака, болезни Ходжкина, ВПЧ-связанные злокачественные опухоли, саркомы Капоши, лейкоза, рака печени, рака легкого, лимфоцитарной лимфомы, лимфомы, меланомы, метастатического рака, множественной миеломы, неоплазмы центральной нервной системы (ЦНС), неходжкинской лимфомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, аденомы гипофиза, первичной лимфомы ЦНС, рака предстательной железы, рефрактерных или рецидивирующих злокачественных опухолей, почечно-клеточной карциномы, саркомы, саркомы мягких тканей, рака кожи, солидных опухолей у детей, опухолей спинного мозга, плоскоклеточного рака, рака желудка, Т-клеточной лимфомы, рака яичек и карциномы эндометрия.

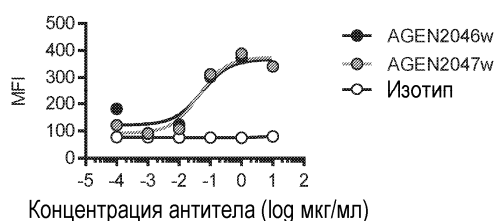
35. Способ по п.33 или 34, где фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутриопухолево или внутривенно.

36. Способ по любому из пп.33-35, дополнительно содержащий введение дополнительного терапевтического средства индивиду.

37. Способ по п.36, где дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент, радиотерапевтический агент или агент, нацеленный на контрольную точку.

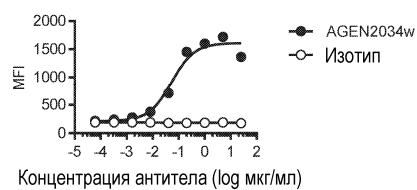
38. Способ по п.37, где агент, нацеленный на контрольную точку, выбран из группы, состоящей из антагонистического анти-PD-1 антитела, антагонистического анти-PD-L1 антитела, антагонистического анти-PD-L2 антитела, антагонистического анти-CTLA-4 антитела, антагонистического анти-TIM-3 антитела, антагонистического анти-LAG-3 антитела, антагонистического анти-CEACAM1 антитела, антагонистического анти-TIGIT антитела, агонистического анти-CD137 антитела, агонистического анти-ICOS антитела, агонистического анти-GITR антитела и агонистического анти-OX40 антитела.

Стимулированные SEA человеческие Т-клетки

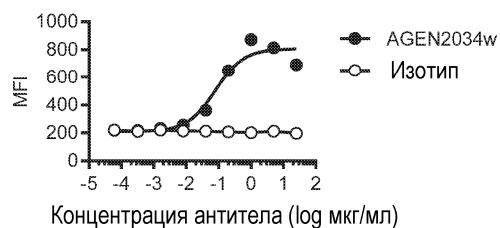


Фиг. 1А

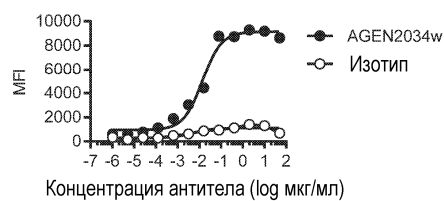
Стимулированные SEA человеческие Т-клетки



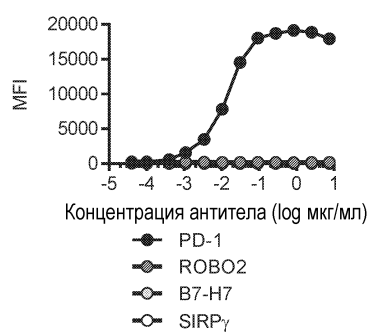
Фиг. 1В

Стимулированные SEB Т-клетки
яванского макака

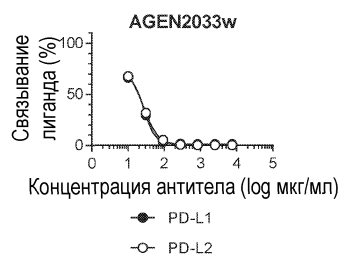
Фиг. 1С

Стимулированные SEA человеческие
Т-клетки

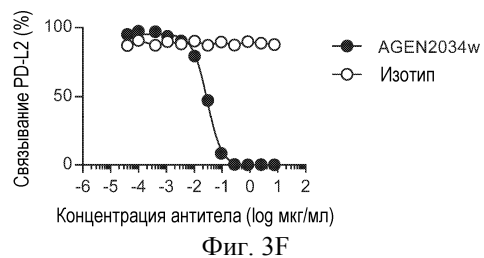
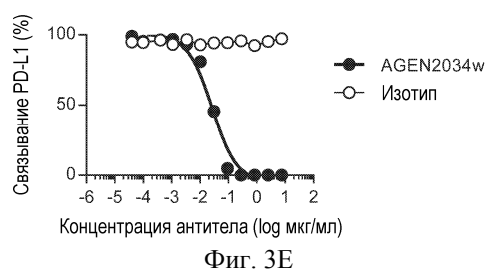
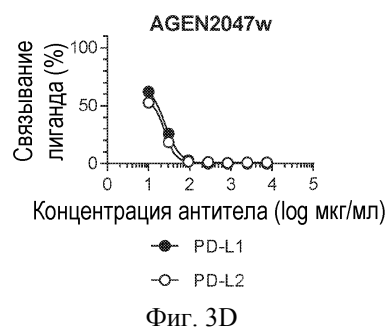
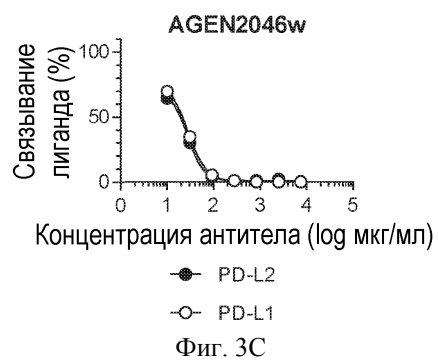
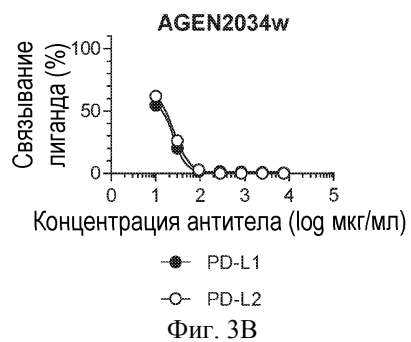
Фиг. 1D



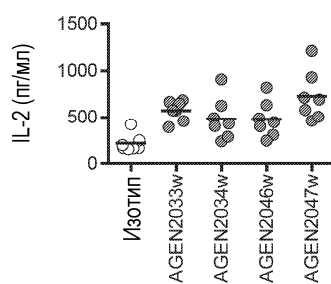
Фиг. 2



Фиг. 3А

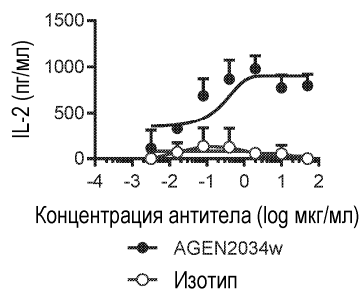


**Стимулированные SEA
человеческие PBMC**



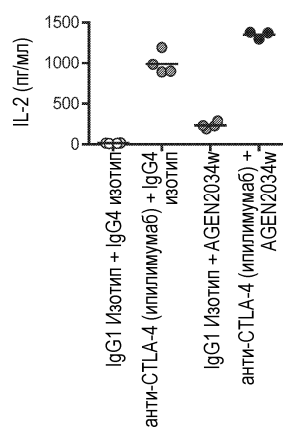
Фиг. 4А

**Стимулированные SEA
человеческие PBMC**



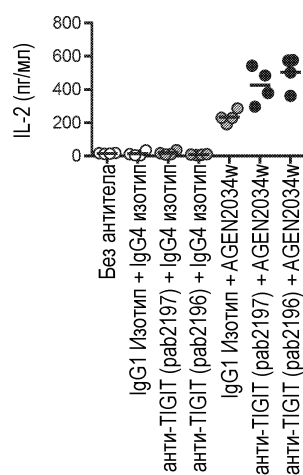
Фиг. 4В

Комбинация с анти-CTLA-4 антителом



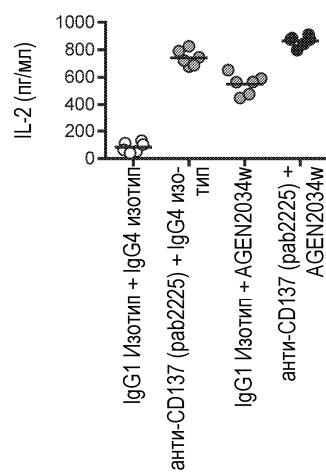
Фиг. 4С

Комбинация с анти-TIGIT антителом



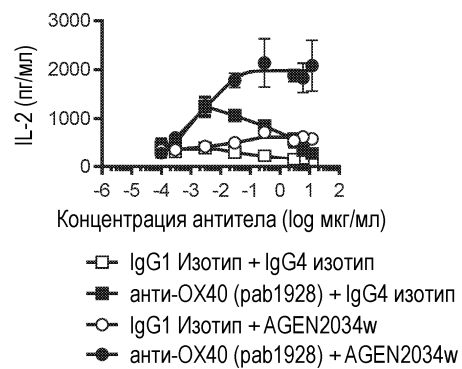
Фиг. 4D

Комбинация с анти-CD137 антителом



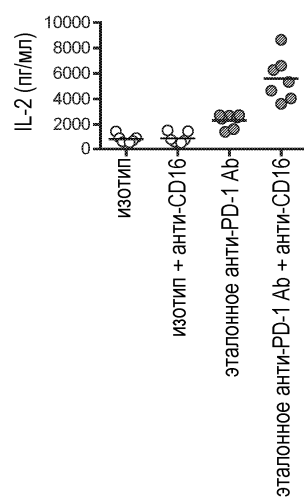
Фиг. 4E

Комбинация с анти-OX40 антителом



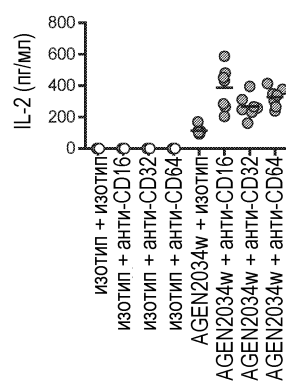
Фиг. 4F

Стимулированные SEA человеческие PBMC



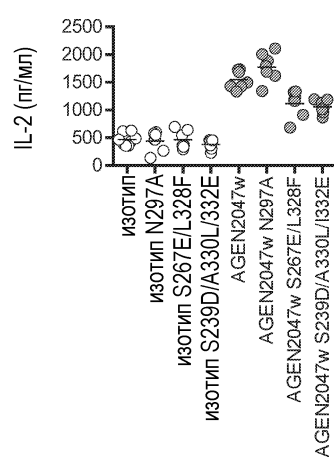
Фиг. 5А

Стимулированные SEA человеческие PBMC

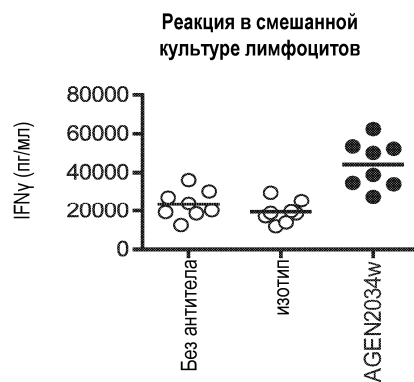


Фиг. 5В

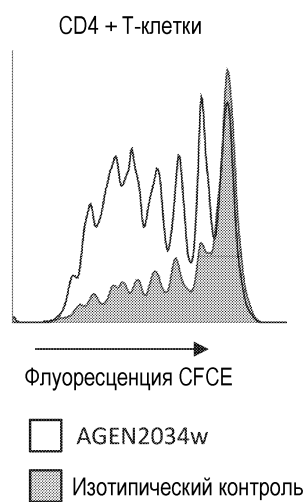
Стимулированные SEA человеческие PBMC



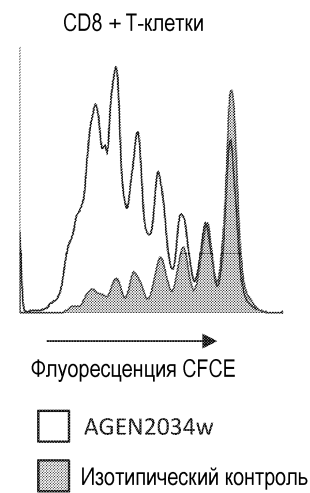
Фиг. 5С



Фиг. 6

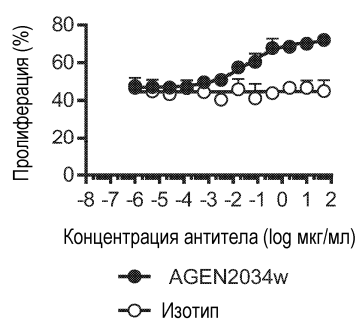


Фиг. 7A



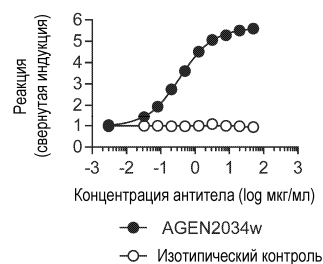
Фиг. 7B

Анализ на супрессию асцитической жидкости



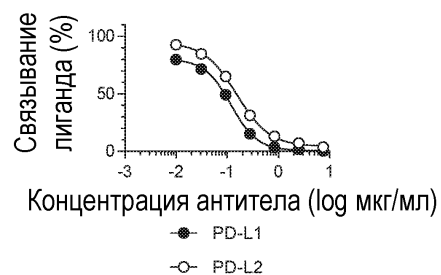
Фиг. 7С

Репортерный анализ Юрката-NFAT-люциферазы



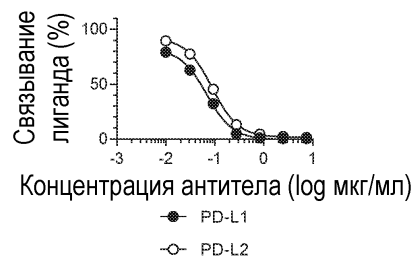
Фиг. 8

AGEN2001w



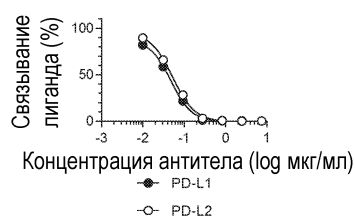
Фиг. 9А

AGEN2002W



Фиг. 9В

EP11_p11_B03



Фиг. 9С

