

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202193301 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.18

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.06.04

(54) АГОНИСТ PD-1 И СПОСОБ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/857,699; 62/863,193; 62/983,512

(72) Изобретатель:

(32) 2019.06.05; 2019.06.18; 2020.02.28

Кери Мэрилин, Пармли Стефен,
Морсе Роберт П., Голд Грегори Н.,
Фишер Джанин, Даль Мартин
Эдвард, Марино Маргарет Хабаш,
Калапанда Рупал (US)

(33) US

(86) PCT/US2020/036143

(87) WO 2020/247648 2020.12.10

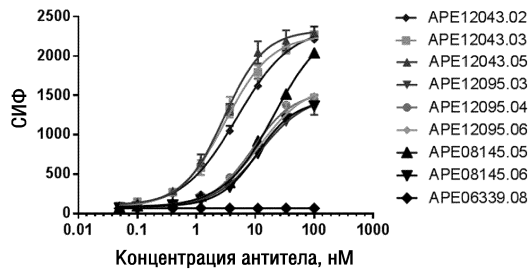
(88) 2021.01.14

(71) Заявитель:
АНАПТИСБАЙО, ИНК. (US)

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

(57) Изобретение относится к связывающему PD-1 агенту, содержащему полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина и полипептид легкой цепи иммуноглобулина, а также к связанным с ним композициям и способам их получения и применения.

Клетки НЕК 293,
трансфицированные PD-1 человека



202193301

A1

A1

202193301

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572096EA/050

АГОНИСТ PD-1 И СПОСОБ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] По этой заявке на патент испрашивается приоритет временной заявки на патент США 62/857699, поданной 5 июня 2019 г; временной заявки на патент США 62/863193, поданной 18 июня 2019 г; и временной заявки на патент США 62/983512, поданной 28 февраля 2020 г, полное раскрытие которых включено в настоящую заявку путем ссылки.

Уровень техники

[0002] Белок 1 запрограммированной смерти (PD-1) (также известный как белок 1 запрограммированной клеточной смерти) представляет собой трансмембранный белок типа I из 268 аминокислот, первоначально идентифицированный вычитающей гибридизацией линии Т-клеток мышей, подвергающейся апоптозу (Ishida et al., *Embo J.*, 11: 3887-95 (1992)). PD-1 является членом семейства CD28/CTLA-4 регуляторов Т-клеток и, как сообщается, экспрессируется на активированных Т-клетках, В-клетках и клетках миелоидного происхождения (Greenwald et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 23: 515-548 (2005); и Sharpe et al., *Nat. Immunol.*, 8: 239-245 (2007)).

[0003] Были идентифицированы два лиганда для PD-1, лиганд PD 1 (PD-L1) и лиганд PD 2 (PD-L2), оба из которых принадлежат к суперсемейству белков B7 (Greenwald et al., см. выше). PD-L1 экспрессируется в различных типах клеток, включая клетки легких, сердца, тимуса, селезенки и почек (см., например, Freeman et al., *J. Exp. Med.*, 192 (7): 1027- 1034 (2000); и Yamazaki et al., *J. Immunol.*, 169 (10): 5538-5545 (2002)). Экспрессия PD-L1 повышается на макрофагах и дендритных клетках (DC) в ответ на обработку липополисахаридом (ЛПС) и ГМ-КСФ, а также на Т-клетках и В-клетках при передаче сигналов через рецепторы Т-клеток и В-клеток. PD-L1 также экспрессируется во множестве линий опухолевых клеток мыши и человека (см., например, Iwai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 (19): 12293-12297 (2002); и Blank et al., *Cancer Res.*, 64 (3): 1140-1145 (2004)). Напротив, PD-L2 демонстрирует более ограниченный паттерн экспрессии и экспрессируется в основном антигенпрезентирующими клетками (например, дендритными клетками и макрофагами) и некоторыми линиями опухолевых клеток (см., например, Latchman et al., *Nat. Immunol.*, 2 (3): 261-238 (2001)).

[0004] PD-1 негативно регулирует активацию Т-клеток, и эта ингибирующая функция связана с иммунорецепторным тирозиновым переключающим мотивом (ITSM) в цитоплазматическом домене (см., например, Greenwald et al., выше; и Parry et al., *Mol. Cell. Biol.*, 25: 9543-9553 (2005)). Было обнаружено, что индуцированная PD-L1 кластеризация PD-1 вызывает рекрутирование фосфатазы SHP2, которая предпочтительно дефосфорилирует CD28, подавляя функцию Т-клеток (Hui et al., *Science*, 355: 1428-1433 (2017)). Дефицит PD-1 может привести к аутоиммунитету. Например, было показано, что у мышей линии C57BL/6 с нокаутом PD-1 развивается волчаночноподобный синдром (см.,

например, Nishimura et al., *Immunity*, 11: 141-1151 (1999)). У людей однонуклеотидный полиморфизм в гене PD-1 связан с более высокой частотой системной красной волчанки, диабета 1 типа, ревматоидного артрита и прогрессирования рассеянного склероза (см., например, Nielsen et al., *Tissue Antigens*, 62 (6): 492-497 (2003); Bertias et al., *Arthritis Rheum.*, 60 (1): 207-218 (2009); Ni et al., *Hum. Genet.*, 121 (2): 223-232 (2007); Tahoori et al., *Clin. Exp. Rheumatol.*, 29 (5): 763-767 (2011); и Kroner et al., *Ann. Neurol.*, 58 (1): 50-57 (2005)).

[0005] Несмотря на недавние достижения в ингибировании активности PD-1 для лечения различных типов рака и для иммунопотенцирования (например, для лечения инфекционных заболеваний), существует потребность в связывающем PD-1 агенте (например, антителе), который связывает PD-1 с высокой аффинностью, который способствует подавлению передачи сигнала и действует как агонист PD-1.

Сущность изобретения

[0006] Изобретение относится к агонистическому связывающему PD-1 агенту. В одном варианте осуществления изобретения связывающий PD-1 агент содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина и переменную область легкой цепи иммуноглобулина, где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит: CDR1, содержащую SEQ ID NO: 1; CDR2, содержащую SEQ ID NO: 2; и CDR3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит CDR1, содержащую SEQ ID NO: 4; CDR2, содержащую SEQ ID NO: 5; и CDR3, содержащую SEQ ID NO: 6.

[0007] Также изобретение относится к анти-PD-1 связывающему агенту, содержащему переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина с по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 24-33 или переменную область тяжелой цепи, содержащую, по меньшей мере, области CDR с последовательностями SEQ ID NO: 24-33, и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина с по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 34 или 35, или переменную область легкой цепи, содержащую, по меньшей мере, области CDR с последовательностями SEQ ID NO: 34 или 35.

[0008] В другом аспекте связывающий PD-1 агент содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина и переменную область легкой цепи иммуноглобулина, где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит CDR1, содержащую SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую SEQ ID NO: 8; и CDR3, содержащую SEQ ID NO: 9; и переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит CDR1, содержащую SEQ ID NO: 10; CDR2, содержащую SEQ ID NO: 11; и CDR3, содержащую SEQ ID NO: 12.

[0009] Также изобретение относится к анти-PD-1 связывающему агенту, содержащему переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина с по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 43-47 или 61-63, или переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере ее области

CDR, и или вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина с по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 48-50, или вариабельную область легкой цепи, содержащую по меньшей мере ее области CDR.

[0010] Кроме того, изобретение относится к выделенным или очищенным нуклеотидным последовательностям, кодирующим указанные выше полипептиды иммуноглобулинов, векторам, содержащим такие нуклеотидные последовательности, выделенным связывающим PD-1 агентам, содержащим указанные выше полипептиды иммуноглобулинов, нуклеотидным последовательностям, кодирующим такие связывающие PD-1 агенты, векторам, содержащим такие нуклеотидные последовательности, изолированным клеткам, содержащим такие векторы, композициям, содержащим такие связывающие PD-1 агенты или такие векторы с фармацевтически приемлемым носителем, и способам ингибирования иммунного ответа и лечения воспалительных или аутоиммунных нарушений у млекопитающих путем введения эффективные количества таких композиций млекопитающим.

Краткое описание нескольких видов чертежей

[0011] Фигура 1 представляет собой график, изображающий результаты связывания анти-PD-1 антител с клетками НЕК 293, стабильно трансфицированными человеческим PD-1.

[0012] Фигура 2 представляет собой график, изображающий результаты связывания анти-PD-1 антител с клетками НЕК 293, стабильно трансфицированными PD-1 яванского макака.

[0013] Фигура 3 представляет собой график, изображающий результаты связывания анти-PD-1 антител с 2-дневными анти-CD3/анти-CD28 активированными CD4+ Т-клетками периферической крови человека.

[0014] Фигуры 4-7 представляют собой графики, показывающие результаты тестирования анти-PD-1 антител, конкурирующих или с PD-L1-Fc, или с PD-L2-Fc за связывание с клетками PD-1 CHO-K1.

[0015] Фигура 4 представляет собой график, изображающий результаты конкурентного анализа, который иллюстрирует способность анти-PD-1 антител конкурировать с PD-L1-Fc за связывание с клетками CHO-K1, стабильно трансфицированными человеческим PD-1.

[0016] Фигура 5 представляет собой график, изображающий результаты конкурентного анализа, который иллюстрирует способность анти-PD-1 антител конкурировать с PD-L1-Fc за связывание с клетками CHO-K1, стабильно трансфицированными человеческим PD-1.

[0017] Фигура 6 представляет собой график, изображающий результаты конкурентного анализа, который иллюстрирует способность анти-PD-1 антител конкурировать с PD-L2-Fc за связывание с клетками CHO-K1, стабильно трансфицированными человеческим PD-1.

[0018] Фигура 7 представляет собой график, изображающий результаты

конкурентного анализа, который иллюстрирует способность анти-PD-1 антител конкурировать с PD-L2-Fc за связывание с клетками CHO-K1, стабильно трансфицированными PD-1 человека.

[0019] Фигура 8А представляет собой диаграмму, изображающую характеристики агонистической активности анти-PD-1 антител в анализе с нанесенными на гранулы агонистами для CD4⁺ Т-клеток с использованием отношения гранул к клеткам 2:1.

[0020] Фигура 8В представляет собой диаграмму, изображающую характеристики агонистической активности анти-PD-1 антител в анализе с нанесенными на гранулы агонистами для CD4⁺ Т-клеток с использованием отношения гранул к клеткам 1:1.

[0021] Фигура 9А представляет собой диаграмму, изображающую характеристики агонистической активности анти-PD-1 антител в анализе с нанесенными на гранулы агонистами для CD4⁺ Т-клеток с использованием отношения гранул к клеткам 4:1.

[0022] Фигура 9В представляет собой диаграмму, изображающую характеристики агонистической активности анти-PD-1 антител в анализе с нанесенными на гранулы агонистами для CD4⁺ Т-клеток с использованием отношения гранул к клеткам 2:1.

[0023] Фигура 9С представляет собой диаграмму, изображающую характеристики агонистической активности анти-PD-1 антител в анализе с нанесенными на гранулы агонистами для CD4⁺ Т-клеток с использованием отношения гранул к клеткам 1:1.

[0024] Фигура 10А представляет собой диаграмму, изображающую средний % ингибирования продукции IFN γ у нескольких доноров в анализе с нанесенными на гранулы агонистами для CD4⁺ Т-клеток для анти-PD-1 антитела.

[0025] Фигура 10В представляет собой таблицу, в которой содержится описание анти-PD-1 антител, % ингибирования IFN γ и количество доноров, для результатов, представленных на фигуре 10А.

[0026] Фигура 11А представляет собой диаграмму, изображающую средний % ингибирования продукции IFN γ у нескольких доноров в анализе с нанесенными на гранулы агонистами для CD4⁺ Т-клеток для анти-PD-1 антитела.

[0027] Фигура 11В представляет собой диаграмму, изображающую средний % ингибирования продукции IFN γ у тех же доноров в анализе с нанесенными на гранулы агонистами для CD4⁺ Т-клеток для эталонного агониста PD-1, PD-L1-Fc.

[0028] Фигура 11С представляет собой таблицу, в которой представлены антитела-кандидаты, описание антител, % ингибирования IFN γ и количество доноров, для результатов, представленных на Фигурах 11А и 11В.

[0029] Фигура 12А представляет собой график, изображающий агонистическую активность анти-PD-1 антитела в ингибировании продукции IL-2 в анализе агонистов для МКПК человека на планшетах (донор № 747).

[0030] Фигура 12В представляет собой график, изображающий агонистическую активность анти-PD-1 антитела и PD-L1-Fc в ингибировании продукции IL-2 в анализе агонистов для МКПК человека на планшетах (донор № 500).

[0031] Фигура 13А представляет собой график, изображающий агонистическую

активность анти-PD-1 антитела и PD-L1-Fc в ингибировании продукции IL-2 в анализе агонистов для МКПК человека на планшете (замороженный образец от донора № 500).

[0032] Фигура 13В представляет собой график, изображающий агонистическую активность анти-PD-1 антитела и PD-L1-Fc в ингибировании продукции IL-2 в анализе агонистов для МКПК человека на планшете (замороженный образец от донора № 500).

[0033] Фигура 14А представляет собой график, изображающий агонистическую активность анти-PD-1 антитела и PD-L1-Fc в ингибировании продукции IL-2 в анализе агонистов для МКПК человека на планшете (замороженный образец от донора № 1202).

[0034] Фигура 14В представляет собой график, изображающий агонистическую активность анти-PD-1 антитела и PD-L1-Fc в ингибировании продукции IL-2 в анализе агонистов для МКПК человека на планшете (замороженный образец от донора № 1202).

[0035] Фигура 15А представляет собой график, изображающий наблюдаемую агонистическую активность тетрамера PD-L1-Fc в анализе ответа на столбняк цельной крови человека и отсутствие агонистической активности ниволумаба в присутствии блокирующих анти-PD-L1/анти-PD-L2.

[0036] Фигура 15В представляет собой график, изображающий наблюдаемую агонистическую активность агонистических анти-PD-1 антител в анализе ответа на столбняк цельной крови человека в присутствии блокирующих анти-PD-L1/анти-PD-L2.

[0037] Фигура 15С представляет собой график, изображающий действие IgG1 дикого типа агонистического анти-PD-1 антитела (закрашенные треугольные точки данных) на IFN γ в анализе ответа на столбняк цельной крови человека.

[0038] Фигура 15D представляет собой график, изображающий действие изотипа IgG2 анти-PD-1 антитела (незакрашенные треугольные точки данных) на IFN γ в анализе ответа на столбняк цельной крови человека.

[0039] Фигура 16А представляет собой схему ксеногенной мышинной модели NSG/Hu-PBMC для исследования реакции «трансплантат против хозяина», как описано в Примере 8, в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

[0040] Фигура 16В представляет собой схему, показывающую временную шкалу, график дозирования и группы модели NSG/Hu-PBMC в исследовании реакции «трансплантат против хозяина», как описано в Примере 8, в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

[0041] Фигура 16С представляет собой график, изображающий результаты исследования реакции «трансплантат против хозяина» в модели NSG/Hu-PBMC до момента времени потери $\geq 10\%$ массы тела, как описано в Примере 8 для анти-PD-1 антитела.

[0042] Фигура 16D представляет собой график, изображающий результаты исследования реакции «трансплантат против хозяина» в модели NSG/Hu-PBMC до момента времени потери $\geq 10\%$ массы тела, как описано в Примере 8 для анти-PD-1 антитела.

[0043] Фигура 17А представляет собой график, изображающий

фармакокинетические свойства у яванских макак после внутривенного или подкожного однократного введения 10 мг/кг анти-PD-1 антитела.

[0044] Фигура 17В представляет собой график, изображающий фармакокинетические свойства у яванских макак после внутривенного или подкожного однократного введения 10 мг/кг анти-PD-1 антитела.

[0045] Фигура 18А представляет собой график, изображающий занятость рецептора PD-1 CD3⁺ Т-клеток у яванских макак после внутривенного или подкожного однократного введения 10 мг/кг анти-PD-1 антитела.

[0046] Фигура 18В представляет собой график, изображающий занятость рецептора PD-1 CD3⁺ Т-клеток у яванских макак после внутривенного или подкожного однократного введения 10 мг/кг анти-PD-1 антитела.

[0047] Фигура 19А представляет собой гель SDS-ПААГ, показывающий результаты иммуноблоттинга иммунопреципитатов PD-1 с анти-PD-1 (вверху), анти-SHP2 (в центре) или анти-SHP1 (внизу).

[0048] Фигура 19В представляет собой диаграмму, изображающую количественную денситометрическую оценку иммуноблота, показанного на Фигуре 19А.

[0049] Фигура 20А представляет собой изображение ленточной модели кристаллической структуры внеклеточного домена PD-1 человека (черный), совмещенную с пространственной моделью кристаллической структуры внеклеточного связывающего домена PD-L1 человека (серый). Молекула ориентирована так, что ближняя к мембране область PD-1 расположена слева внизу.

[0050] Фигура 20В представляет собой изображение ленточной модели кристаллической структуры внеклеточного домена PD-1 человека (черный), совмещенную с пространственной моделью кристаллической структуры внеклеточного связывающего домена PD-L1 человека (серый). Молекула повернута на 90° по сравнению с видом молекулы, показанным на Фигуре 20А, так, что ближняя к мембране область PD-1 расположена в центре внизу.

[0051] Фигура 21А представляет собой график, изображающий действие IgG1 3.7C6 анти-PD-1 антитела на секретлируемый IFN γ в МКПК от доноров с очаговой алопецией, стимулированных кератиноцитарными антигенами, по сравнению с изотипом IgG1.

[0052] Фигура 21В представляет собой график, изображающий действие тетрамера PD-L1-IgG1 Fc на секретлируемый IFN γ в МКПК от доноров с очаговой алопецией, стимулированных кератиноцитарными антигенами, по сравнению с тетрамером изотипа IgG1.

[0053] Фигура 21С представляет собой график, изображающий действие IgG1 3.7C6 анти-PD-1 антитела на количество образующих ореол клеток (SFC), продуцирующих IFN γ в МКПК, выделенных от доноров с очаговой алопецией, стимулированных кератиноцитарными антигенами.

[0054] Фигура 21D представляет собой график, изображающий действие тетрамера

PD-L1 IgG1-Fc на количество образующих ореол клеток (SFC), продуцирующих $IFN\gamma$ в МКПК, выделенных от доноров с очаговой алопецией, стимулированных кератиноцитарными антигенами.

[0055] Фигура 22А представляет собой график, изображающий действие IgG1 3.7C6 анти-PD-1 антитела на секретируемый $IFN\gamma$ в тесте на специфичный антигенный ответ на столбнячный анатоксин, по сравнению с изотипом IgG1.

[0056] Фигура 22В представляет собой график, изображающий действие IgG1 3.7C6 анти-PD-1 антитела на секретируемый IL-17А в тесте на специфичный антигенный ответ на столбнячный анатоксин, по сравнению с изотипом IgG1.

[0057] Фигура 23А представляет собой график, изображающий действие IgG1 3.7C6 анти-PD-1 антитела на секретируемый $IFN\gamma$ в МКПК от доноров с очаговой алопецией, стимулированных меланоцитарными антигенами, по сравнению с изотипом igG1.

[0058] Фигура 23В представляет собой график, изображающий действие тетрамера PD-L1-IgG1-Fc на секретируемый $IFN\gamma$ в МКПК от доноров с очаговой алопецией, стимулированных меланоцитарными антигенами, по сравнению с тетрамером изотипа IgG1.

[0059] Фигура 23С представляет собой график, изображающий действие IgG1 3.7C6 анти-PD-1 антитела на количество SFC, продуцирующих $IFN\gamma$, в МКПК, выделенных от доноров с очаговой алопецией, стимулированных меланоцитарными антигенами.

[0060] Фигура 23D представляет собой график, изображающий действие тетрамера PD-L1 IgG1-Fc на количество SFC, продуцирующих $IFN\gamma$, в МКПК, выделенных от доноров с очаговой алопецией, стимулированных меланоцитарными антигенами.

[0061] Фигура 24А представляет собой схему ксеногенной мышинной модели NSG/Hu-PBMC для исследования реакции «трансплантат против хозяина», как описано в Примере 15, в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

[0062] Фигура 24В представляет собой схему, показывающую временную шкалу, график дозирования и группы модели NSG/Hu-PBMC в исследовании реакции «трансплантат против хозяина», как описано в Примере 15, в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

[0063] Фигура 24С представляет собой график, изображающий результаты исследования реакции «трансплантат против хозяина» в модели NSG/Hu-PBMC до момента времени смерти в Примере 15 для агонистического анти-PD-1 антитела IgG1 3.7C6.

[0064] Фигура 24D представляет собой график, изображающий результаты изменения массы тела в процентах с начала исследования отдельных животных для изотипического контроля во время исследования.

[0065] Фигура 24Е представляет собой график, изображающий результаты изменения массы тела в процентах с начала исследования отдельных животных для

агонистического анти-PD-1 антитела IgG1 3.7C6 в дозе 30 мг/кг во время исследования.

[0066] Фигура 24F представляет собой график, изображающий результаты изменения массы тела в процентах с начала исследования отдельных животных для агонистического анти-PD-1 антитела IgG1 3.7C6 в дозе 10 мг/кг во время исследования.

[0067] Фигура 24G представляет собой график, изображающий результаты изменения массы тела в процентах с начала исследования отдельных животных для агонистического анти-PD-1 антитела IgG1 3.7C6 в дозе 3 мг/кг во время исследования.

[0068] Фигура 24H представляет собой график, изображающий результаты изменения массы тела в процентах с начала исследования отдельных животных для положительного контроля CTLA-4-Ig во время исследования.

Подробное описание изобретения

[0069] Изобретение относится к связывающему PD-1 агенту. Как обсуждалось выше, белок 1 запрограммированной смерти (PD-1) (также известный как белок 1 запрограммированной клеточной смерти) представляет собой трансмембранный белок типа I из 268 аминокислот (Ishida et al., см. выше). PD-1 является членом семейства CD28/CTLA-4 регуляторов Т-клеток и, как сообщается, экспрессируется на активированных Т-клетках, В-клетках и клетках миелоидного происхождения (Greenwald et al., см. выше; и Sharpe et al. см. выше). PD-1 включает внеклеточный домен IgV, за которым следует короткая внеклеточная ножка, трансмембранная область и внутриклеточный хвост. Внутриклеточный хвост PD-1 содержит два сайта фосфорилирования, расположенные в иммунорецепторном тирозиновом ингибирующем мотиве и в иммунорецепторном тирозиновом переключающем мотиве, которые в фосфорилированном состоянии функционируют таким образом, чтобы негативно регулировать передачу сигналов Т-клеточного рецептора (см., например, Ishida et al. выше; и Blank et al., выше) путем привлечения тирозинфосфатаз.

[0070] В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанный здесь связывающий PD-1 агент является агонистическим, что означает, что связывающий PD-1 агент связывается с PD-1, но не значительно ингибирует связывание PD-1 с лигандом PD-1, тем самым поддерживая способность PD-1 отрицательно регулировать передачу сигналов Т-клеточного рецептора. В соответствии с определенными вариантам осуществления изобретения предлагаемые здесь связывающие PD-1 агенты могут индуцировать или стимулировать способность PD-1 отрицательно регулировать передачу сигналов Т-клеточного рецептора и подавлять иммунный ответ. В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к связывающему PD-1 агенту, который связывает PD-1 в эпитопе, содержащем, в значительной степени состоящем из, или состоящем из остатков 33-41 человеческого PD1 (последовательность: NPPTFSPAL) и/или 96-110 человеческого PD1 (последовательность: RVTQLPNGRDFHMSV).

[0071] Связывающий PD-1 агент содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина и переменную область легкой цепи иммуноглобулина, каждая из которых содержит три определяющих комплементарность области (CDR), обычно

называемых CDR1, CDR2 или CDR3. Области CDR также могут упоминаться с использованием «H» или «L» в номенклатуре для обозначения тяжелой или легкой цепи, соответственно, то есть CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 или CDRL3. CDR данной последовательности Ig можно определить с помощью любой из нескольких традиционных схем нумерации, таких как нумерация по Кэботу, нумерация по Чотиа, нумерация по Мартину (улучшенная нумерация по Чотиа), IGMT или АНо (см., например, Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH (1991); Chothia, et al., *Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins*, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987); Al-Lazikani et al., *Standard Conformations for the Canonical Structures of Immunoglobulins*, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948 (1997); Abhinandan et al., *Analysis and Improvements to Kabat and Structurally Correct Numbering of Antibody Variable Domains*, *Mol. Immunol.*, 45: 3832-3839 (2008); Lefranc et al., *The IMGT unique numbering for immunoglobulins, T cell Receptors and Ig-like domains*, *The Immunologist*, 7: 132-136 (1999); Lefranc et al., *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and I superfamily V-like domains*, *Dev. Comp. Immunol.*, 27: 55-77 (2003); и Honegger et al., *Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool*, *J. Mol. Biol.* 309: 657-670 (2001).

[0072] В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина связывающего PD-1 агента включает CDR1, содержащую SEQ ID NO: 1; CDR2, содержащую SEQ ID NO: 2; и CDR3, содержащую SEQ ID NO: 3; и переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит CDR1, содержащую SEQ ID NO: 4; CDR2, содержащую SEQ ID NO: 5; и CDR3, содержащую SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения CDR1 тяжелой цепи содержит любую из SEQ ID NO: 13-18. В дополнение или альтернативно, в некоторых вариантах осуществления изобретения CDR3 тяжелой цепи содержат любую из SEQ ID NO: 19-21. Кроме того, CDR1 легкой цепи может содержать SEQ ID NO: 22 или 23.

[0073] В конкретных вариантах осуществления изобретения связывающий PD-1 агент может содержать переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 24-33 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO: 24-33. В других вариантах осуществления изобретения связывающий PD-1 агент содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую CDR любой из SEQ ID NO: 24-33, где CDR являются такими, как указано выше или как определено в соответствии с любой

из различных известных схем нумерации иммуноглобулинов (например, нумерация по Кэботу, нумерация по Чотиа, нумерация по Мартину (улучшенная нумерация по Чотиа), IGMT или АНо). Необязательно, переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащая CDR любой из SEQ ID NO: 24-33, также имеет аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности по меньшей мере 80%, 85% или 90% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO: 24-33.

[0074] В дополнение к переменной области тяжелой цепи Ig, описанной выше, или альтернативно, связывающий анти-PD-1 агент может содержать переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 34 или 35 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 34 или 35. В других вариантах осуществления изобретения связывающий PD-1 агент содержит переменную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую CDR SEQ ID NO: 34 или 35, где CDR являются такими, как указано выше или как определено в соответствии с любой из различных известных схем нумерации иммуноглобулинов (например, нумерация по Кэботу, нумерация по Чотиа, нумерация по Мартину (улучшенная нумерация по Чотиа), IGMT или АНо). Необязательно, переменная область легкой цепи иммуноглобулина, содержащая CDR SEQ ID NO: 34 или 35, также имеет аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности, по меньшей мере 80%, 85% или 90% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 34 или 35.

[0075] В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения связывающий PD-1 агент может содержать переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 29 или аминокислотную последовательность с идентичностью с ней по последовательности по меньшей мере 80%, 85% или 90% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по

меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или 100% идентичности последовательности); или переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере CDR SEQ ID NO: 29, где области CDR являются такими, как указано выше (например, CDR1 - SEQ ID NO: 15, CDR2 - SEQ ID NO: 2 и CDR3 - SEQ ID NO: 20) или как определено в соответствии с любой из различных известных схем нумерации иммуноглобулинов (например, нумерация по Кэботу, нумерация по Чотиа, нумерация по Мартину (улучшенная нумерация по Чотиа), IGMT или АНо); и переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 35 или аминокислотную последовательность с идентичностью с ней по последовательности по меньшей мере 80%, 85% или 90% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности), или переменную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере CDR SEQ ID NO: 35; где области CDR являются такими, как указано выше (например, CDR1 - SEQ ID NO: 23, CDR2 - SEQ ID NO: 5 и CDR3 - SEQ ID NO: 6) или как определено в соответствии с любой из различных известных схем нумерации иммуноглобулинов (например, нумерация по Кэботу, нумерация по Чотиа, нумерация по Мартину (улучшенная нумерация по Чотиа), IGMT или АНо). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 29 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 35 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией по Кэботу. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 29 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 35 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией по Чотиа. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 29 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 35 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией по Мартину. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 29 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 35 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией IGMT. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 29 и переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 35 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией АНо. В качестве

дополнительного примера, связывающий анти-PD-1 агент может содержать тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую SEQ ID NO: 37, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 36 и 37 соответственно, где последовательность необязательно сохраняет CDR тяжелой цепи и легкой цепи SEQ ID NO: 36 и 37 соответственно, где CDR являются такими, как указано выше или как определено в соответствии с любой из различных известных схем нумерации иммуноглобулинов (например, нумерация по Кэботу, нумерация по Чотиа, нумерация по Мартину (улучшенная нумерация по Чотиа), IGMT или АНо).

[0076] В соответствии с другим вариантом осуществления изобретения связывающий PD-1 агент может содержать переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 24 или аминокислотную последовательность с идентичностью с ней по последовательности, по меньшей мере 80%, 85% или 90% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или 100% идентичности последовательности); или переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере CDR SEQ ID NO: 24, где области CDR являются такими, как указано выше (например, CDR1 - SEQ ID NO: 13, CDR2 - SEQ ID NO: 2 и CDR3 - SEQ ID NO: 19) или как определено в соответствии с любой из различных известных схем нумерации иммуноглобулинов (например, нумерация по Кэботу, нумерация по Чотиа, нумерация по Мартину (улучшенная нумерация по Чотиа), IGMT или АНо); и переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 34 или аминокислотную последовательность с идентичностью с ней по последовательности, по меньшей мере 80%, 85% или 90% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности), или переменную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере

CDR SEQ ID NO: 34; где области CDR являются такими, как указано выше (например, CDR1 - SEQ ID NO: 22, CDR2 - SEQ ID NO: 5 и CDR3 - SEQ ID NO: 6) или как определено в соответствии с любой из различных известных схем нумерации иммуноглобулинов (например, нумерация по Кэботу, нумерация по Чотиа, нумерация по Мартину (улучшенная нумерация по Чотиа), IGMT или АНо). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 24 и переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 34 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией по Кэботу. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 24 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 34 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией по Чотиа. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 24 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 34 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией по Мартину. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 24 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 34 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией IGMT. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 24 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 34 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией АНо.

[0077] В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения связывающий PD-1 агент может содержать переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 30 или аминокислотную последовательность с идентичностью с ней по последовательности, по меньшей мере 80%, 85% или 90% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или 100% идентичности последовательности); или переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере CDR SEQ ID NO: 30, где области CDR являются такими, как указано выше (например, CDR1 - SEQ ID NO: 15, CDR2 - SEQ ID NO: 2 и CDR3 - SEQ ID NO: 21) или как определено в соответствии с любой из различных известных схем нумерации иммуноглобулинов (например, нумерация по Кэботу, нумерация по Чотиа, нумерация по Мартину (улучшенная нумерация по Чотиа), IGMT или АНо); и переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 35 или аминокислотную последовательность с идентичностью с ней по последовательности, по меньшей мере 80%, 85% или 90% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%,

по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности), или переменную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере CDR SEQ ID NO: 35; где области CDR являются такими, как указано выше (например, CDR1 - SEQ ID NO: 23, CDR2 - SEQ ID NO: 5 и CDR3 - SEQ ID NO: 6) или как определено в соответствии с любой из различных известных схем нумерации иммуноглобулинов (например, нумерация по Кэботу, нумерация по Чотиа, нумерация по Мартину (улучшенная нумерация по Чотиа), IGMT или АНо). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 30 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 35 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией по Кэботу. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 30 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 35 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией по Чотиа. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 30 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 35 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией по Мартину. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 30 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 35 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией IGMT. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 30 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 35 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией АНо.

[0078] В соответствии с другим аспектом, связывающий анти-PD-1 агент содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую: CDR1, содержащую SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую SEQ ID NO: 8; и CDR3, содержащую SEQ ID NO: 9; и переменную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую CDR1, содержащую SEQ ID NO: 10; CDR2, содержащую SEQ ID NO: 11; и CDR3, содержащую SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления изобретения CDR1 тяжелой цепи содержит любую из SEQ ID NO: 57-60. В некоторых вариантах осуществления изобретения CDR2 тяжелой цепи содержит любую из SEQ ID NO: 38-42.

[0079] В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий PD-1 агент содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина с любой из последовательностей SEQ ID NO: 43-47 или 61-63 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, или 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%,

по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO: 43-47 или 61-63. В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий PD-1 агент содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую CDR любой из SEQ ID NO: 43-47 или 61-63, где CDR являются такими, как указано выше или как определено в соответствии с любой из различных известных схем нумерации иммуноглобулинов (например, нумерация по Кэботу, нумерация по Чотиа, нумерация по Мартину (улучшенная нумерация по Чотиа), IGMT или АН0). Необязательно, переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащая CDR любой из SEQ ID NO: 43-47 или 61-63, также имеет аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности, по меньшей мере 80%, 85% или 90% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO: 43-47 или 61-63.

[0080] В дополнение к описанной выше переменной области тяжелой цепи Ig (например, SEQ ID NO: 43-47 или 61-63) или альтернативно связывающий анти-PD-1 агент может содержать переменную область легкой цепи иммуноглобулина с любой из последовательностей SEQ ID NO: 48-50 или аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности, по меньшей мере 80%, 85% или 90% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO: 48-50. В других вариантах осуществления изобретения связывающий PD-1 агент содержит переменную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую CDR с любой из последовательностей SEQ ID NO: 48-50, где CDR являются такими, как указано выше или как определено в соответствии с любой из различных известных схем нумерации иммуноглобулинов (например, нумерация по Кэботу, нумерация по Чотиа, нумерация по Мартину (улучшенная нумерация по Чотиа), IGMT или АН0). Необязательно, переменная область легкой цепи иммуноглобулина, содержащая CDR любой из SEQ ID NO: 48-50, также имеет аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности, по меньшей мере 80%, 85% или 90% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%,

по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO: 48-50.

[0081] В конкретном варианте осуществления изобретения связывающий анти-PD-1 агент содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 47 или аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности, по меньшей мере 80%, 85% или 90% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 47; или переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере CDR SEQ ID NO: 47, где области CDR являются такими, как указано выше (например, CDR1 - SEQ ID NO: 57, CDR2 - SEQ ID NO: 42 и CDR3 - SEQ ID NO: 9) или как определено в соответствии с любой из различных известных схем нумерации иммуноглобулинов (например, нумерация по Кэботу, нумерация по Чотиа, нумерация по Мартину (улучшенная нумерация по Чотиа), IGMT или АНо); и переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 49 или аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности, по меньшей мере 80%, 85% или 90% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 49; или переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере CDR SEQ ID NO: 49; где области CDR являются такими, как указано выше (например, CDR1 - SEQ ID NO: 10, CDR2 - SEQ ID NO: 11 и CDR3 - SEQ ID NO: 12) или как определено в соответствии с любой из различных известных схем нумерации иммуноглобулинов (например, нумерация по Кэботу, нумерация по Чотиа, нумерация по Мартину (улучшенная нумерация по Чотиа), IGMT или АНо). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 47 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 49 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией по Кэботу. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 47 и переменную область

легкой цепи SEQ ID NO: 49 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией по Чотиа. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 47 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 49 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией по Мартину. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 47 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 49 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией IGMT. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 47 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 49 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией АНо. В качестве дополнительного примера, связывающий анти-PD-1 агент может содержать тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую SEQ ID NO: 51, и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую SEQ ID NO: 52, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 51 и 52, необязательно где последовательность сохраняет CDR тяжелой и легкой цепей SEQ ID NO: 51 и 52, как указано выше или как определено в соответствии с любой из различных известных схем нумерации иммуноглобулинов (например, нумерация по Кэботу, нумерация по Чотиа, нумерация по Мартину (улучшенная нумерация по Чотиа), IGMT или АНо).

[0082] В другом варианте осуществления изобретения связывающий анти-PD-1 агент содержит вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 46 или аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности, по меньшей мере 80%, 85% или 90% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 46; или вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере CDR SEQ ID NO: 46, где области CDR являются такими, как указано выше (например, CDR1 - SEQ ID NO: 57, CDR2 - SEQ ID NO: 41 и CDR3 - SEQ ID NO: 9) или как определено в соответствии с любой из различных известных схем нумерации иммуноглобулинов (например, нумерация по Кэботу, нумерация по Чотиа, нумерация по Мартину (улучшенная нумерация по Чотиа),

IGMT или АНо); и вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 50 или аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности, по меньшей мере 80%, 85% или 90% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 50; или вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере CDR SEQ ID NO: 50; где области CDR являются такими, как указано выше (например, CDR1 - SEQ ID NO: 10, CDR2 - SEQ ID NO: 11 и CDR3 - SEQ ID NO: 12) как определено в соответствии с любой из различных известных схем нумерации иммуноглобулинов (например, нумерация по Кэботу, нумерация по Чотиа, нумерация по Мартину (улучшенная нумерация по Чотиа), IGMT или АНо). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 50 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией по Кэботу. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 50 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией по Чотиа. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 50 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией по Мартину. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 50 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией IGMT. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 50 или по меньшей мере их CDR, как определено в соответствии с нумерацией АНо.

[0083] «Идентичность» по последовательности, как описано здесь, может быть определена путем сравнения представляющей интерес нуклеотидной или аминокислотной последовательности с эталонной нуклеотидной или аминокислотной последовательностью. Процент идентичности - это количество нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются такими же (т.е. идентичными), у представляющей интерес последовательности и эталонной последовательности, деленное на длину самой длинной последовательности (т.е. длину или последовательности представляющей интерес или эталонной последовательности, в зависимости от того, какая из них длиннее). Известен ряд математических алгоритмов для получения оптимального выравнивания и вычисления идентичности между двумя или более последовательностями,

включенных в ряд доступных компьютерных программ. Примеры таких программ включают в себя CLUSTAL-W, T-Coffee и ALIGN (для выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей), программы BLAST (например, BLAST 2.1, BL2SEQ и их более поздние версии) и программы FASTA (например, FASTA3x, FASTM и SSEARCH) (для выравнивания последовательностей и поиска сходства между последовательностями). Алгоритмы выравнивания последовательностей также раскрыты, например, в Altschul et al., *J. Molecular Biol.*, 215 (3): 403-410 (1990), Beigert et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106 (10): 3770-3775 (2009), Durbin et al., Eds., *Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press, Cambridge, UK (2009), Soding, *Bioinformatics*, 21 (7): 951-960 (2005), Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25 (17): 3389-3402 (1997), и Gusfield, *Algorithms on Strings, Trees and Sequences*, Cambridge University Press, Cambridge UK (1997)).

[0084] Изменение идентичности последовательностей может быть достигнуто путем добавления, замены или делеции одного или нескольких аминокислотных остатков. Термин «замена» или «замена» аминокислоты относится к замене одной аминокислоты в данном положении или остатке другой аминокислотой в том же положении или остатке в полипептидной последовательности. Аминокислотная замена или замещение могут быть консервативными, полуконсервативными или неконсервативными в зависимости от того, производится ли замена аминокислотным остатком, который имеет свойства, аналогичные заменяемому остатку. Функциональный способ определения общих свойств между отдельными аминокислотами представляет собой анализ нормализованной частоты аминокислотных изменений между соответствующими белками гомологичных организмов (Schulz and Schirmer, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, New York (1979)). Согласно такому анализу могут быть определены группы аминокислот, в которых аминокислоты внутри группы предпочтительно заменяются друг другом и, следовательно, больше всего похожи друг на друга по своему влиянию на общую структуру белка (Schulz and Schirmer, см. выше).

[0085] Аминокислоты можно в широком смысле разделить на «ароматические» или «алифатические». Ароматическая аминокислота содержит ароматическое кольцо. Примеры «ароматических» аминокислот включают в себя гистидин (H или His), фенилаланин (F или Phe), тирозин (Y или Tyr) и триптофан (W или Trp). Неароматические аминокислоты широко классифицируются как «алифатические». Примеры «алифатических» аминокислот включают в себя глицин (G или Gly), аланин (A или Ala), валин (V или Val), лейцин (L или Leu), изолейцин (I или Ile), метионин (M или Met), серин (S или Ser), треонин (T или Thr), цистеин (C или Cys), пролин (P или Pro), глутаминовую кислоту (E или Glu), аспарагиновую кислоту (A или Asp), аспарагин (N или Asn), глутамин (Q или Gln), лизин (K или Lys) и аргинин (R или Arg).

[0086] Алифатические аминокислоты можно подразделить на четыре подгруппы. «Большая подгруппа неполярных алифатических аминокислот» состоит из валина, лейцина и изолейцина. «Подгруппа слабополярных алифатических аминокислот» состоит

из метионина, серина, треонина и цистеина. «Подгруппа полярных/заряженных алифатических аминокислот» состоит из глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, аспарагина, глутамина, лизина и аргинина. «Подгруппа аминокислот с небольшими остатками» состоит из глицина и аланина. Группа заряженных/полярных аминокислот может быть подразделена на три подгруппы: «подгруппа положительно заряженных аминокислот», состоящая из лизина и аргинина, «подгруппа отрицательно заряженных аминокислот», состоящая из глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, и «подгруппа полярных аминокислот», состоящая из аспарагина и глутамина.

[0087] Ароматические аминокислоты могут быть подразделены на две подгруппы: «подгруппа аминокислот с азотным кольцом», состоящая из гистидина и триптофана, и «фенильная подгруппа», состоящая из фенилаланина и тирозина.

[0088] Примеры консервативных аминокислотных замен включают в себя замены аминокислот в пределах описанных выше подгрупп, например, замена лизина на аргинин и наоборот, так что может сохраняться положительный заряд, замена глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту и наоборот, так что может сохраняться отрицательный заряд, замена серина для треонина, так что может сохраняться свободная -ОН группа, и замена глутамина на аспарагина, так что может сохраняться свободная -NH₂ группа. «Полуконсервативные мутации» включают в себя аминокислотные замены аминокислот в пределах тех же групп, перечисленных в здесь, но не в пределах одной и той же подгруппы. Например, в заменах аспарагиновой кислоты на аспарагин или аспарагина на лизин участвуют аминокислоты одной и той же группы, но разных подгрупп. «Неконсервативные мутации» включают в себя замены аминокислот между различными группами, например, лизин на триптофан или фенилаланин на серин и т.д.

[0089] В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий PD-1 агент может содержать, в значительной степени состоять из или состоять из вариативной области тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина или полноразмерных полипептидов тяжелой и легкой цепей, представленных здесь. Выделенный связывающий PD-1 агент может представлять собой молекулу или конструкцию любого типа, содержащую по меньшей мере указанные вариативные области тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина. Таким образом, связывающий PD-1 агент может представлять собой, например, цельный иммуноглобулин или антитело, как описано здесь, или антигенсвязывающий (связывающий PD-1) «фрагмент» иммуноглобулина или антитела. Термин «фрагмент», используемый в отношении антитела или иммуноглобулина, означает любую молекулу или конструкцию, которая включает некоторую часть иммуноглобулина или антитела и связывается с целевым антигеном. Такой фрагмент обычно будет включать в себя, по меньшей мере части вариативных областей тяжелой и легкой цепи, включая CDR, и может также включать в себя части константных областей, необязательно вместе с другими элементами, которые обычно не являются частью иммуноглобулина или антитела (например, линкеры и т.д.). Примеры таких «фрагментов» включают в себя без ограничений (i) фрагмент Fab, который представляет собой одновалентный фрагмент,

состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, (ii) фрагмент F (ab')₂, который представляет собой двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области, (iii) фрагмент F_v, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (iv) фрагмент Fab', который образуется в результате разрыва дисульфидного мостика фрагмента F(ab')₂ в мягких восстанавливающих условиях; (v) диатело; (vi) одноцепочечную переменную область (scFv) и (vii) стабилизированный дисульфидными связями фрагмент Fv (dsFv).

[0090] В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий PD-1 агент содержит константную область тяжелой цепи иммуноглобулина, такую как область кристаллизующегося фрагмента (Fc) или ее часть. Fc-область может относиться к любому классу/подклассу Ig (IgA (IgA1, IgA2), IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgM, включая их варианты. В конкретном варианте осуществления изобретения связывающий PD-1 агент содержит Fc-область, которая связывает Fc-рецептор антигенпрезентирующей клетки (например, дендритной клетки, макрофага, клетки Лангерганса или В-клетки). Fc-рецептор может представлять собой рецептор Fcγ (FcγR), таким как FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIB (CD32), FcγRIIA (CD16a), FcγRIIB (CD16b). В одном варианте осуществления изобретения связывающий PD-1 агент содержит Fc-область, которая связывает FcγR, такую как IgG1. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий PD-1 агент представляет собой «цельный» или «полный» Ig (т.е. антитело). В дополнительных вариантах осуществления изобретения связывающий PD-1 агент представляет собой антитело IgG, в частности антитело IgG1.

[0091] Выделенный связывающий PD-1 агент также может представлять собой конъюгат антитела. В этом отношении выделенный связывающий PD-1 агент может представлять собой конъюгат, содержащий связывающий PD-1 агент (например, анти-PD-1 антитело или фрагмент антитела) и другой биологически активный фрагмент. Например, связывающий PD-1 агент может быть конъюгирован с пептидом, флуоресцентной молекулой или химиотерапевтическим агентом, особенно агентом, применимым для подавления иммунного ответа.

[0092] Выделенный связывающий PD-1 агент может представлять собой или может быть получен из человеческого антитела, нечеловеческого антитела или химерного антитела. Под «химерным» подразумевается антитело или его фрагмент, включающее как человеческие, так и нечеловеческие области. Предпочтительно выделенный связывающий PD-1 агент представляет собой гуманизированное антитело. «Гуманизированное» антитело представляет собой моноклональное антитело, содержащее каркас человеческого антитела и, по меньшей мере одну CDR, выделенную или полученную из нечеловеческого антитела. Нечеловеческие антитела включают в себя антитела, полученные от любого животного, не являющегося человеком, такого как, например, грызун (например, мышь или крыса). Гуманизированное антитело может содержать одну, две или три CDR, выделенных или полученных из нечеловеческого антитела. В предпочтительном варианте осуществления изобретения CDRH3 связывающего PD-1

агента настоящего изобретения выделена или получена из мышинового моноклонального антитела, в то время как остальные переменные области и константная область связывающего PD-1 агента настоящего изобретения выделены или получены из человеческого моноклонального антитела.

[0093] Человеческое антитело, нечеловеческое антитело, химерное антитело или гуманизированное антитело можно получить любыми способами, в том числе через источники *in vitro* (например, гибридому или клеточную линию, рекомбинантно продуцирующую антитело) и источники *in vivo* (например, грызуны). Способы получения антител известны в данной области техники и описаны, например, в Köhler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5: 511-519 (1976); Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988); and Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001); Starkie et al., *PLoS One*, 11(3): e0152282 (2016)). В некоторых вариантах осуществления изобретения человеческое антитело или химерное антитело можно получить с использованием трансгенного животного (например, мыши), в котором один или несколько генов эндогенного иммуноглобулина заменены одним или несколькими генами иммуноглобулина человека. Примеры трансгенных мышей, у которых гены эндогенных антител эффективно заменены генами человеческих антител, включают в себя без ограничений Medarex HUMAB-MOUSE™, Kirin TC MOUSE™ и Kyowa Kirin KM-MOUSE™ (см., например, Lonberg, *Nat. Biotechnol.*, 23 (9): 1117-25 (2005), и Lonberg, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 181: 69-97 (2008)). Гуманизированное антитело можно получить с использованием любого подходящего метода, известного в данной области техники (см., например, An, Z. (ed.), *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (2009)), включая, например, трансплантацию нечеловеческих CDR на каркас человеческого антитела (см., например, Kashmiri et al., *Methods*, 36(1): 25-34 (2005); и Hou et al., *J. Biochem.*, 144(1): 115-120 (2008)). В одном варианте осуществления изобретения гуманизированное антитело можно получить с использованием способов, описанных, например, в публикации заявки на патент США 2011/0287485 A1.

[0094] Связывающий PD-1 агент может иметь любую подходящую аффинность к человеческому PD-1. Термин «аффинность» относится к константе равновесия для обратимого связывания двух агентов и выражается как константа диссоциации (K_D). Аффинность связывающего агента к лиганду, такое как сродство антитела к эпитопу, может составлять, например, от примерно 1 пиколя (пМ) до примерно 100 микроля (мкМ) (например, от примерно 1 пиколя (пМ) до примерно 1 наноля (нМ), от примерно 1 нМ до примерно 1 микроля (мкМ) или от примерно 1 мкМ до примерно 100 мкМ). В одном варианте осуществления изобретения связывающий PD-1 агент может связываться с белком PD-1 с K_D меньшей или равной 1 нМ (например, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ, 0,025 нМ, 0,01 нМ, 0,001 нМ или в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеперечисленных значений). В другом варианте осуществления изобретения, связывающий PD-1 агент может

связываться с PD-1 с K_D меньшей или равной 200 пМ (например, 190 пМ, 175 пМ, 150 пМ, 125 пМ, 110 пМ, 100 пМ, 90 пМ, 80 пМ, 75 пМ, 60 пМ, 50 пМ, 40 пМ, 30 пМ, 25 пМ, 20 пМ, 15 пМ, 10 пМ, 5 пМ, 1 пМ или в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеперечисленных значений). В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий PD-1 агент является перекрестно реактивным с PD-1 яванского макака с аффинностью в любом из вышеупомянутых диапазонов, обсуждаемых в отношении человеческого PD-1. Аффинность иммуноглобулина к интересующему антигену или эпитопу можно измерить с помощью любого признанного в данной области техники способа анализа. Такие способы включают в себя, например, сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS), разделяемые частицы (например, магнитные частицы), поверхностный плазмонный резонанс (SPR), конкуренцию жидкой фазы (KinExA®), пэннинг антигена и/или твердофазный ИФА (см., например, Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5th ed., Garland Publishing, New York, NY, 2001).

[0095] Связывающий PD-1 агент связывает PD-1, но предпочтительно не полностью подавляет способность PD-1 отрицательно регулировать иммунный ответ или, в некоторых случаях, существенно не ингибирует способность PD-1 отрицательно регулировать иммунный ответ или даже усиливает способность PD-1 отрицательно регулировать иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий PD-1 агент не полностью блокирует связывание между PD-1 и PD-L1 или, предпочтительно, существенно не снижает связывание между PD-1 и PD-L1. Оценка степени, в которой связывающий PD-1 агент ингибирует PD-1-регуляцию иммунного ответа или связывание PD-1 с PD-L1, может быть выполнена с использованием способов анализа, таких как те, что изложены в примерах, или других способов анализа, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий PD-1 агент ингибирует связывание PD-1 с PD-L1 не более чем примерно на 80%, не более чем примерно на 75%, не более чем примерно на 70%, не более чем примерно на 65%, не более чем примерно на 60%, не более чем примерно на 55%, не более чем примерно на 50%, не более чем примерно на 45%, не более чем примерно на 40%, не более чем примерно на 35%, не более чем примерно на 30%, не более чем примерно на 25%, не более чем примерно на 20%, не более чем примерно на 15%, не более чем на 10%.

Способы применения/лечения

[0096] Настоящее изобретение относится к способу подавления иммунного ответа, в частности иммунного ответа, опосредованного Т-клетками, у млекопитающего путем введения млекопитающему описанного здесь связывающего PD-1 агента. Настоящее изобретение также относится к способу лечения заболевания или нарушения, при котором снижение активности PD-1 (например, снижение передачи сигналов PD-1 за счет снижения связывания с PD-L1, такое как снижение отрицательной регуляции иммунной системы) вызывает или способствует патологическим эффектам заболевания или любого заболевания или нарушения, при котором увеличение активности PD-1 (например,

усиление передачи сигналов PD-1 через связывание с PD-L1, такое как усиление отрицательной регуляции иммунная система) будет иметь терапевтический эффект, данный способ включает введение млекопитающему описанного здесь связывающего PD-1 агента для уменьшения или устранения любого симптома нарушения или предотвращения или подавления появления таких симптомов. Используемый здесь термин «отрицательная регуляция иммунной системы» является синонимом иммуносупрессии. Следует понимать, что связывающий PD-1 агент можно вводить до появления симптомов в некоторых случаях (например, до воздействия антигена, который запускает иммунный ответ), чтобы предотвратить, подавить или уменьшить тяжесть иммунного ответа при введении антигена.

[0097] Заболевание или нарушение может быть воспалительным или аутоиммунным. Примеры воспалительных или аутоиммунных нарушений включают в себя, например, инфекции (вирусные, бактериальные, грибковые и паразитарные), эндотоксический шок, связанный с инфекцией, артрит, ревматоидный артрит, астму, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), воспалительное заболевание органов малого таза, болезнь Бехчета, болезнь Альцгеймера, воспалительное заболевание кишечника, включая болезнь Крона и язвенный колит, болезнь Пейрони, целиакию, заболевание желчного пузыря, пилонидальное заболевание, перитонит, псориаз, псориатический артрит, васкулит, васкулит, ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (АНЦА-ассоциированный васкулит), послеоперационные спайки, инсульт, диабет типа I, болезнь Лайма, артрит, менингоэнцефалит, аутоиммунный увеит, иммуноопосредованные воспалительные заболевания центральной и периферической нервной системы, такие как рассеянный склероз, волчанка (например, системная красная волчанка и хроническая дискоидная красная волчанка) и синдром Гийена-Барре, атопический дерматит, полимиозит, дерматомиозит, аутоиммунный гепатит, фиброзирующий альвеолит, болезнь Грейвса, IgA-нефропатию, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, болезнь Меньера, пузырчатку, пемфигоид, первичный билиарный холангит, гепатит, саркоидоз, склеродермию (локализованная склеродермия, системная склеродермия и прогрессирующая системная склеродермия), ганглематоз с полиангиитом, другие аутоиммунные заболевания, холангит, панкреатит, травму (хирургическую), реакцию «трансплантат против хозяина», отторжение трансплантата, сердечные заболевания, включая ишемические заболевания, такие как инфаркт миокарда, а также атеросклероз, узелковый периартериит (узелковый полиартериит и микроскопический полиангиит), аллергический гранулематозный ангиит, гиперчувствительный ангиит, синдром аортита (артериит Такаясу), височный артериит, внутрисосудистую коагуляцию, резорбцию костной ткани, остеопороз, остеоартрит, пародонтит и гипохлоргидию, болезнь Стилла, синдром Когана, RS3PE, ревматическую полимиалгию, синдром фибромиалгии, синдром антифосфолипидных антител, эозинофильный фасциит, синдром Гийена-Барре, миастению гравис, хронический атрофический гастрит, синдром Гудпасчера, быстро

прогрессирующий гломерулонефрит, мегалобластную анемию, гемолитическую анемию, аутоиммунную нейтропению, тиреоидит Хашимото, аутоиммунную надпочечниковую недостаточность, первичный гипотиреоз, идиопатическую болезнь Аддисона (хроническая надпочечниковая недостаточность), гестационный герпес, линейный IgA-зависимый буллезный дерматоз, приобретенный буллезный эпидермолиз, очаговую алопецию, витилиго, болезнь Харада, аутоиммунную оптическую нейропатию, идиопатическую азооспермию, рецидивирующую потерю плода или бесплодие, связанное с отсутствием толерантности организма матери к плоду.

[0098] В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание или нарушение представляет собой гигантоклеточный артериит, ревматическую полимиалгию, первичный синдром Шегрена, ФНО-рефрактерный ревматоидный артрит, очаговую алопецию, первичный билиарный холангит (ПБХ), реакцию «трансплантата против хозяина» (РТПХ), витилиго, АНЦА-ассоциированный васкулит, васкулит, диабет 1 типа или неинфекционный увеит.

[0099] «Иммунный ответ» может повлечь за собой, например, продуцирование антител и/или активацию иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток), продуцирование воспалительных цитокинов или любые признаки или нарушения, описанные здесь или известные из уровня техники. Используемые здесь термины «лечение», «лечить» и тому подобное относятся к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Предпочтительно эффект является терапевтическим, т.е. эффект частично или полностью излечивает заболевание и/или неблагоприятный симптом, связанный с заболеванием. С этой целью способ настоящего изобретения включает введение «терапевтически эффективного количества» связывающего PD-1 агента. Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст, пол и вес индивидуума, а также способность связывающего PD-1 агента вызывать желаемый ответ у индивидуума.

[00100] Альтернативно, фармакологический и/или физиологический эффект может быть профилактическим, то есть эффект полностью или частично предотвращает заболевание или его симптом. В этом отношении способ настоящего изобретения включает введение «профилактически эффективного количества» связывающего PD-1 агента. Термин «профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата (например, предотвращение начала заболевания).

[00101] Связывающий PD-1 агент может быть частью композиции, подходящей для введения млекопитающему. Предпочтительно композиция представляет собой фармацевтически приемлемую (например, физиологически приемлемую) композицию,

которая включает носитель, предпочтительно фармацевтически приемлемый (например, физиологически приемлемый) носитель, и аминокислотные последовательности, антигенсвязывающий агент или вектор в соответствии с настоящим изобретением. В контексте настоящего изобретения можно использовать любой подходящий носитель, и такие носители хорошо известны в данной области техники. Выбор носителя будет частично определяться конкретным местом, в которое может быть введена композиция, и конкретным методом, используемым для введения композиции. Композиция также может включать в себя любое другое вспомогательное вещество, используемое в композициях терапевтических молекул (например, белков или антител), в частности парентеральных композиций, включая, например, буферы, модификаторы тоничности, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества и тому подобное. Композиция необязательно может быть стерильной. Композиция может быть заморожена или лиофилизована для хранения и восстановлена в подходящем стерильном носителе перед использованием. Композиции могут быть получены при помощи обычных методов, описанных, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2001).

[00102] Типичная доза связывающего PD-1 агента может находиться, например, в диапазоне от 1 пг/кг до 20 мг/кг массы тела животного или человека; однако дозы ниже или выше этого примерного диапазона входят в объем настоящего изобретения. Суточная парентеральная доза может составлять от примерно 0,00001 мкг/кг до примерно 20 мг/кг общей массы тела (например, примерно 0,001 мкг/кг, примерно 0,1 мкг/кг, примерно 1 мкг/кг, примерно 5 мкг/кг, примерно 10 мкг/кг, примерно 100 мкг/кг, примерно 500 мкг/кг, примерно 1 мг/кг, примерно 5 мг/кг, примерно 10 мг/кг или диапазон, определяемый любыми двумя из вышеуказанных значений), предпочтительно от примерно 0,1 мкг/кг до примерно 10 мг/кг общей массы тела (например, примерно 0,5 мкг/кг, примерно 1 мкг/кг, примерно 50 мкг/кг, примерно 150 г/кг, примерно 300 мкг/кг, примерно 750 мкг/кг, примерно 1,5 мг/кг, примерно 5 мг/кг или диапазон, определяемый любыми двумя из вышеуказанных значений), более предпочтительно примерно от 1 мкг/кг до 5 мг/кг общей массы тела (например, примерно 3 мкг/кг, примерно 15 мкг/кг, примерно 75 мкг/кг, примерно 300 мкг/кг, примерно 900 мкг/кг, примерно 2 мг/кг, примерно 4 мг/кг или диапазон, определяемый любыми двумя из вышеуказанных значений), и еще более предпочтительно примерно от 0,5 до 15 мг/кг массы тела в сутки (например, примерно 1 мг/кг, примерно 2,5 мг/кг, примерно 3 мг/кг, примерно 6 мг/кг, примерно 9 мг/кг, примерно 11 мг/кг, примерно 13 мг/кг или диапазон, определяемый любыми двумя из вышеуказанных значений). Терапевтическую или профилактическую эффективность можно контролировать путем периодической оценки пациентов, получающих лечение. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение можно повторять до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Однако могут применяться и другие режимы дозирования, которые входят в объем изобретения. Желаемая доза может быть

доставлена однократным болюсным введением композиции, многократным болюсным введением композиции или непрерывным инфузионным введением композиции.

[00103] Связывающий PD-1 агент можно вводить млекопитающему с использованием стандартных методик введения, включая пероральное, внутривенное, внутрибрюшинное, подкожное, легочное, трансдермальное, внутримышечное, интраназальное, буккальное, сублингвальное или суппозиторийное введение. Композиция предпочтительно подходит для парентерального введения. Используемый здесь термин «парентеральный» включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. Более предпочтительно композиция вводится млекопитающему с использованием периферической системной доставки путем внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции.

[00104] После введения млекопитающему (например, человеку) биологическая активность связывающего PD-1 агента настоящего изобретения может быть измерена любым подходящим способом, известным в данной области техники. Например, биологическая активность может быть оценена путем определения стабильности конкретного связывающего PD-1 агента. В одном варианте осуществления изобретения связывающий PD-1 агент (например, антитело) имеет время полужизни *in vivo* от примерно 30 минут до 45 дней (например, примерно 30 минут, примерно 45 минут, примерно 1 час, примерно 2 часа, примерно 4 часа, примерно 6 часов, примерно 10 часов, примерно 12 часов, примерно 1 день, примерно 5 дней, примерно 10 дней, примерно 15 дней, примерно 25 дней, примерно 35 дней, примерно 40 дней, примерно 45 дней, или диапазон, определяемый любыми двумя из вышеуказанных значений). В другом варианте осуществления изобретения связывающий PD-1 агент имеет время полужизни *in vivo* от примерно 2 часов до 20 дней (например, примерно 5 часов, примерно 10 часов, примерно 15 часов, примерно 20 часов, примерно 2 дня, примерно 3 дня, примерно 7 дней, примерно 12 дней, примерно 14 дней, примерно 17 дней, примерно 19 дней или диапазон, определяемый любыми двумя из вышеуказанных значений). В другом варианте осуществления изобретения связывающий PD-1 агент имеет время полужизни *in vivo* от примерно 10 дней до примерно 40 дней (например, примерно 10 дней, примерно 13 дней, примерно 16 дней, примерно 18 дней, примерно 20 дней, примерно 23 дня, примерно 26 дней, примерно 29 дней, примерно 30 дней, примерно 33 дня, примерно 37 дней, примерно 38 дней, примерно 39 дней, примерно 40 дней или диапазон, определяемый любыми двумя из вышеуказанных значений).

[00105] Связывающий PD-1 агент настоящего изобретения можно вводить отдельно или в комбинации с другими активными агентами или лекарственными средствами. Например, связывающий PD-1 агент можно вводить в комбинации с другими агентами для лечения или предотвращения описанных здесь заболеваний. В этом отношении связывающий PD-1 агент можно применять в комбинации, по меньшей мере с одним другим агентом, ингибирующим воспалительные или аутоиммунные нарушения, включая, например, другие моноклональные антитела, устраняющие заболевание вирусы,

генную терапию и адоптивный перенос Т-клеток и/или хирургическое вмешательство. Связывающий PD-1 агент настоящего изобретения, описанный здесь, также можно применять в комбинации, по меньшей мере с одним другим иммунодепрессивным агентом, включая, например, метотрексат, кортикостероиды и другие низкомолекулярные агенты, используемые для лечения аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Когда способ настоящего изобретения применяется для лечения инфекционного заболевания, связывающий PD-1 агент можно вводить в комбинации, по меньшей мере с одним антибактериальным агентом или по меньшей мере с одним противовирусным агентом. В этом отношении антибактериальный агент может быть любым подходящим антибиотиком, известным в данной области техники. Противовирусным агентом может быть любая вакцина любого подходящего типа, которая специфично нацелена на конкретный вирус (например, живые аттенуированные вакцины, субъединичные вакцины, рекомбинантные векторные вакцины и низкомолекулярные противовирусные препараты (например, ингибиторы репликации вируса и аналоги нуклеозидов)).

[00106] В дополнение к терапевтическим применениям, связывающий PD-1 агент, описанный здесь, можно применять в диагностических или исследовательских целях. В этом отношении, связывающий PD-1 агент можно применять в способе диагностики рака или инфекционного заболевания. Аналогичным образом, связывающий PD-1 агент можно применять в анализе для мониторинга уровней белка PD-1 у субъекта, тестируемого на заболевание или нарушение, связанное с аномальной экспрессией PD-1. Применения для исследований включают в себя, например, способы, в которых используется связывающий PD-1 агент и метка для обнаружения белка PD-1 в образце, например, в жидкости человеческого тела или в клеточном или тканевом экстракте. Связывающий PD-1 агент, можно применять с модификацией или без нее, такой как ковалентное или нековалентное мечение детектируемой частью. Например, детектируемая часть может представлять собой радиоизотоп (например, ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I), флуоресцентное или хемилюминесцентное соединение (например, флуоресцеинизотиоцианат, родамин или люциферин), фермент (например, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или пероксидаза хрена) или простетические группы. Любой способ, известный в данной области техники, для отдельного конъюгирования антигенсвязывающего агента (например, антитела) с детектируемой частью, может быть использован в контексте настоящего изобретения (см., например, Hunter et al., *Nature*, 194: 495-496 (1962); David et al., *Biochemistry*, 13: 1014-1021 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.*, 40: 219-230 (1981); и Nygren, *J. Histochem. Cytochem.*, 30: 407-412 (1982)).

[00107] Уровни белка PD-1 можно измерить с использованием связывающего PD-1 агента настоящего изобретения любым подходящим способом, известным в данной области техники. Такие способы включают в себя, например, радиоиммуноанализ (РИА) и FACS. Нормальные или стандартные значения экспрессии белка PD-1 могут быть установлены с использованием любого подходящего метода, например, путем объединения образца, содержащего полипептид PD-1 или предположительно

содержащего полипептид PD-1, с PD-1-специфичным антителом в условиях, подходящих для образования комплекса антиген-антитело. Антитело прямо или опосредованно метят определяемым веществом, чтобы облегчить обнаружение связанного или несвязанного антитела. Подходящие поддающиеся обнаружению вещества включают в себя различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы и радиоактивные материалы (см., например, Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc. (1987)). Затем количество полипептида PD-1, экспрессируемого в образце, сравнивают со стандартным значением.

[00108] Связывающий PD-1 агент может быть предложен в составе набора, то есть упакованной комбинации реагентов в заранее определенных количествах с инструкциями по выполнению диагностического анализа. Если связывающий PD-1 агент помечен ферментом, то желательно, чтобы набор содержал субстраты и кофакторы, необходимые ферменту (например, предшественник субстрата, который обеспечивает детектируемый хромофор или флуорофор). Кроме того, в набор могут быть включены другие добавки, такие как стабилизаторы, буферы (например, блокирующий буфер или лизирующий буфер) и тому подобное. Относительные количества различных реагентов могут варьироваться для обеспечения концентраций реагентов в растворе, которые существенно оптимизируют чувствительность анализа. Реагенты могут находиться в виде сухих порошков (обычно лиофилизированных), включая вспомогательные вещества, которые при растворении будут давать раствор реагента соответствующей концентрации.

Нуклеиновые кислоты, клетки, способы получения

[00109] Настоящее изобретение также относится к одной или нескольким выделенным или очищенным нуклеотидным последовательностям, которые кодируют связывающий PD-1 агент или его отдельные полипептиды иммуноглобулина тяжелой или легкой цепи. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения нуклеиновая кислота кодирует переменную область легкой цепи иммуноглобулина или полноразмерную легкую цепь иммуноглобулина, как указано здесь. В другом варианте осуществления изобретения нуклеиновая кислота кодирует переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина или полноразмерную тяжелую цепь иммуноглобулина, как указано здесь. В еще одном варианте осуществления изобретения нуклеиновая кислота кодирует как переменную область легкой цепи иммуноглобулина или полноразмерную легкую цепь иммуноглобулина, так и переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина или полноразмерную тяжелую цепь иммуноглобулина, как указано здесь. Примеры нуклеотидной последовательности, кодирующей тяжелую цепь иммуноглобулина, представлены в SEQ ID NO: 53 и 55, которые кодируют переменные области тяжелой цепи SEQ ID NO: 29 и 47, соответственно, и полноразмерные тяжелую и легкую цепи SEQ ID NO: 36 и 51 соответственно. Примеры нуклеотидной последовательности, кодирующей легкую цепь иммуноглобулина, представлены в SEQ ID NO: 54 и 56, которые кодируют переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 35 и 49, соответственно, и полноразмерные тяжелую и легкую цепи SEQ ID. NO: 37 и 52

соответственно.

[00110] Термины «нуклеиновая кислота» и «нуклеотидная последовательность» предназначены для обозначения полимера ДНК или РНК, то есть полинуклеотида, который может быть одноцепочечным или двухцепочечным и который может содержать неприродные или измененные нуклеотиды. Используемые здесь термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, будь то рибонуклеотиды (РНК) или дезоксирибонуклеотиды (ДНК). Эти термины относятся к первичной структуре молекулы и, таким образом, включают двух- и одноцепочечную ДНК, а также двух- и одноцепочечную РНК. Термины включают в себя в качестве эквивалентов аналоги РНК или ДНК, полученные из аналогов нуклеотидов и модифицированных полинуклеотидов, таких как, но без ограничений, метилированные и/или кэпированные полинуклеотиды. Нуклеиновые кислоты обычно связаны через фосфатные связи с образованием нуклеотидных последовательностей или полинуклеотидов, хотя многие другие связи известны в данной области техники (например, фосфоротиоаты, боранофосфаты и тому подобное).

[00111] Нуклеиновая кислота может быть частью вектора. Вектор может быть, например, плазмидой, эписомой, космидой, вирусным вектором (например, ретровирусным или аденовирусным) или фагом. Подходящие векторы и способы получения векторов хорошо известны в данной области техники (см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994)).

[00112] В дополнение к нуклеотидной последовательности, кодирующей тяжелую и/или легкую цепи иммуноглобулина, вектор может содержать последовательности контроля экспрессии, такие как промоторы, энхансеры, сигналы полиаденилирования, терминаторы транскрипции, внутренние сайты посадки рибосомы (IRES) и тому подобное, которые обеспечивают экспрессию кодирующей последовательности в клетке-хозяине. Типичные последовательности контроля экспрессии известны в данной области техники и описаны, например, в Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).

[00113] Большое количество промоторов, включая конститутивные, индуцибельные и репрессируемые промоторы, из множества различных источников хорошо известно в данной области техники. Репрезентативные источники промоторов включают в себя, например, вирус, млекопитающее, насекомое, растения, дрожжи и бактерии, и подходящие промоторы из этих источников легко доступны или могут быть получены синтетически на основе общедоступных последовательностей, например, из таких депозитариев, как АТСС, а также из других коммерческих или индивидуальных источников. Промоторы могут быть однонаправленными (т.е. инициировать транскрипцию в одном направлении) или двунаправленными (т.е. инициировать транскрипцию в 3' или 5' направлениях). Неограничивающие примеры промоторов

включают в себя, например, бактериальную экспрессионную систему T7, бактериальную экспрессионную систему pBAD (araA), промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV. Индуцибельные промоторы включают в себя, например, систему Tet (патенты США Nos. 5464758 и 5814618), систему, индуцируемую экдизоном (No et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 93: 3346-3351 (1996)), систему T-REX™ (Invitrogen, Carlsbad, CA), систему LACSWITCH™ (Stratagene, San Diego, CA) и систему индуцируемой тамоксифеном рекомбиназы Cre-ERT (Indra et al., Nuc. Acid. Res., 27: 4324-4327 (1999); Nuc. Acid. Res., 28: e99 (2000); патент США No. 7112715; и Kramer & Fussenegger, Methods Mol. Biol., 308: 123-144 (2005)).

[0100] Используемый здесь термин «энхансер» относится к последовательности ДНК, которая увеличивает транскрипцию, например, нуклеотидной последовательности, с которой она функционально связана. Энхансеры могут располагаться на расстоянии многих тысяч оснований от кодирующей области нуклеотидной последовательности и могут опосредовать связывание регуляторных факторов, паттерны метилирования ДНК или изменения в структуре ДНК. Большое количество энхансеров из множества различных источников хорошо известно в данной области техники и доступно в виде или внутри клонированных полинуклеотидов (например, из депозитариев, таких как ATCC, а также из других коммерческих или индивидуальных источников). Ряд полинуклеотидов, содержащих промоторы (например, обычно используемый промотор CMV), также содержат энхансерные последовательности. Энхансеры могут быть расположены перед, внутри или после кодирующих последовательностей.

[0101] Вектор также может содержать ген селективируемого маркера. Используемый здесь термин «ген селективируемого маркера» относится к нуклеотидной последовательности, которая позволяет клеткам, экспрессирующим эту нуклеотидную последовательность, быть специфично отобранными (отрицательно или положительно) в присутствии соответствующего селективного агента. Подходящие гены селективируемых маркеров известны в данной области техники и описаны, например, в публикациях международных патентных заявок WO 1992/008796 и WO 1994/028143; Wigler et al., Proc. Natl. Акад. Sci. USA, 77: 3567-3570 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Акад. Sci. USA, 78: 1527-1531 (1981); Mulligan & Berg, Proc. Natl. Акад. Sci. USA, 78: 2072-2076 (1981); Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol., 150: 1-14 (1981); Santerre et al., Gene, 30: 147-156 (1984); Kent et al., Science, 237: 901-903 (1987); Wigler et al., Cell, 11: 223-232 (1977); Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Акад. Sci. США, 48: 2026-2034 (1962); Lowy et al., Cell, 22: 817-823 (1980); и патентах США Nos. 5122464 и 5770359.

[0102] В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой «эписомальный экспрессионный вектор» или «эписому», который способен реплицироваться в клетке-хозяине и сохраняется как внехромосомный сегмент ДНК внутри клетки-хозяина в присутствии подходящего селективного агента. (см., например, Conese et al., Gene Therapy, 11: 1735-1742 (2004)). Репрезентативные коммерчески доступные эписомальные экспрессионные векторы включают в себя без ограничений

эписомальные плазмиды, которые используют ядерный антиген 1 вируса Эпштейна-Барр (EBNA1) и ориджин репликации вируса Эпштейна-Барр (EBV) (oriP). Векторы pREP4, pCER4, pREP7 и pcDNA3.1 от Invitrogen (Carlsbad, CA) и pBK-CMV от Stratagene (La Jolla, CA) представляют собой неограничивающие примеры эписомального вектора, который использует Т-антиген и ориджин репликации SV40 вместо EBNA1 и oriP.

[0103] Другие подходящие векторы включают в себя интегрирующие экспрессионные векторы, которые могут случайным образом интегрироваться в ДНК клетки-хозяина или могут включать в себя сайт рекомбинации, чтобы сделать возможной специфичную рекомбинацию между экспрессионным вектором и хромосомой клетки-хозяина. В таких интегрирующих экспрессионных векторах могут использоваться контролирующие эндогенную экспрессию последовательности хромосом клетки-хозяина для воздействия на экспрессию желаемого белка. Примеры векторов, которые интегрируются сайтспецифичным образом, включают в себя, например, компоненты системы flp-in от Invitrogen (Carlsbad, CA) (например, pcDNATM5/FRT) или систему cre-lox, такую как обнаружена в базовых векторах pExchange-6 от Stratagene (La Jolla, CA). Примеры векторов, которые случайным образом интегрируются в хромосомы клетки-хозяина, включают в себя, например, pcDNA3.3 (при введении в отсутствие Т-антигена) от ThermoFisher (Carlsbad, CA), UCOE от Millipore (Billerica, MA) и pCI или pFN10A. (ACT) FLEXITM от Promega (Madison, WI).

[0104] Также можно использовать вирусные векторы. Репрезентативные коммерчески доступные вирусные экспрессионные векторы включают в себя, помимо прочего, систему Per.C6 на основе аденовируса, доступную от Crucell, Inc. (Leiden, The Netherlands), pLP1 на основе лентивируса от ThermoFisher (Carlsbad, CA) и ретровирусные векторы pFB-ERV plus pCFB-EGSH от Agilent (Stratagene, La Jolla, CA).

[0105] Нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности настоящего изобретения, могут быть предоставлены клетке в одном и том же векторе (т.е. в цис форме). Однонаправленный промотор можно использовать для контроля экспрессии каждой нуклеотидной последовательности. В другом варианте осуществления изобретения комбинацию двунаправленных и однонаправленных промоторов можно использовать для контроля экспрессии нескольких нуклеотидных последовательностей. Нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности настоящего изобретения, альтернативно могут быть предоставлены в популяции клеток в отдельных векторах (т.е. в транс форме). Каждая из нуклеотидных последовательностей в каждом из отдельных векторов может содержать одинаковые или разные последовательности контроля экспрессии. Отдельные векторы можно вводить в клетки одновременно.

[0106] Вектор(ы), содержащий нуклеиновую кислоту(ы), кодирующую аминокислотные последовательности настоящего изобретения, можно ввести в клетку-хозяин, которая способна экспрессировать кодируемые им полипептиды, включая любую подходящую прокариотическую или эукариотическую клетку. Таким образом, настоящее

изобретение относится к клетке или линии клеток *in vitro*, содержащей вектор настоящего изобретения. Изобретение также относится к клетке или клеточной линии *in vitro*, которая экспрессирует полипептиды тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина или экспрессирует связывающий PD-1 агент. Предпочтительными клетками-хозяевами являются те, которые можно легко и надежно выращивать, которые имеют достаточно высокие темпы роста, имеют хорошо охарактеризованные системы экспрессии и могут быть легко и эффективно трансформированы или трансфицированы.

[0107] Примеры подходящих прокариотических клеток включают в себя без ограничений клетки из родов *Bacillus* (такие как *Bacillus subtilis* и *Bacillus brevis*), *Escherichia* (такие как *E. coli*), *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Salmonella* и *Erwinia*. Особенно пригодные прокариотические клетки включают в себя различные штаммы *Escherichia coli* (например, K12, HB101 (ATCC No. 33694), DH5 α , DH10, MC1061 (ATCC No. 53338) и CC102).

[0108] В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор вводят в эукариотическую клетку. Подходящие эукариотические клетки известны в данной области техники и включают в себя, например, дрожжевые клетки, клетки насекомых и клетки млекопитающих. Примеры подходящих дрожжевых клеток включают в себя клетки из родов *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhino-sporidium*, *Saccharomyces* и *Schizosaccharomyces*. Предпочтительные дрожжевые клетки включают в себя, например, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

[0109] Подходящие клетки насекомых описаны, например, в Kitts et al., *Biotechniques*, 14: 810-817 (1993); Lucklow, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 4: 564-572 (1993); и Lucklow et al., *J. Virol.*, 67: 4566-4579 (1993). Предпочтительные клетки насекомых включают в себя Sf-9 и HI5 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

[0110] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении используются клетки млекопитающих. Ряд подходящих клеток-хозяев млекопитающих известен в данной области техники, и многие из них доступны из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Manassas, VA). Примеры подходящих клеток млекопитающих включают в себя без ограничений клетки яичника китайского хомячка (CHO) (например, ATCC No. CCL61), CHO DHFR-клетки (например, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. США.*, 97: 4216-4220 (1980)), клетки почки эмбриона человека (HEK) 293 или 293T (например, ATCC No. CRL1573) и клетки 3T3 (например, ATCC No. CCL92). Другими подходящими клеточными линиями млекопитающих являются клеточные линии COS-1 обезьяны (например, ATCC No. CRL1650) и COS-7 (например, ATCC No. CRL1651), а также линия клеток CV-1 (например, ATCC No. CCL70). Дополнительные примеры клеток-хозяев млекопитающих включают в себя линии клеток приматов и линии клеток грызунов, включая линию клеток мыши NS0, производную линии миеломы мыши MOPC21 (например, Tysabri), и линии трансформированных клеток. Также подходят нормальные диплоидные клетки, клеточные штаммы, полученные из культуры первичной ткани *in vitro*, а также первичные эксплантаты. Другие подходящие линии клеток

млекопитающих включают в себя, без ограничений клетки нейробластомы N2A мыши, HeLa, клетки L-929 мыши и линии клеток хомячка ВНК или HaK, все из которых доступны в ATCC. Способы выбора подходящих клеток-хозяев млекопитающих и способы трансформации, культивирования, амплификации, скрининга и очистки клеток известны в данной области техники.

[0111] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку человека. Например, клетка млекопитающего может быть линией лимфоидных или полученных из лимфоидных клеток человека, такой как линия клеток пре-B-лимфоцитов. Примеры линий лимфоидных клеток человека включают в себя без ограничений клетки RAMOS (например, CRL-1596), Дауди (например, CCL-213), EB-3 (например, CCL-85), Раджи (например, CCL-86), и их производные.

[0112] Нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность настоящего изобретения, может быть введена в клетку любым подходящим способом, например, посредством «трансфекции», «трансформации» или «трансдукции». Используемые здесь термины «трансфекция», «трансформация» или «трансдукция» относятся к введению одного или нескольких экзогенных полинуклеотидов в клетку-хозяина с использованием физических или химических методов. Многие методы трансфекции известны в данной области техники и включают в себя, например, соосаждение ДНК фосфатом кальция (см., например, Murray EJ (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, *Gene Transfer and Expression Protocols*, Humana Press (1991)); ДЭАЭ-декстран; электропорацию; опосредованную липосомами катионную трансфекцию; бомбардировку микрочастицами с использованием частиц вольфрама (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); и соосаждение ДНК фосфатом стронция (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)). Фаговые или вирусные векторы могут быть введены в клетки-хозяева после роста инфекционных частиц в подходящих упаковывающих клетках, многие из которых являются коммерчески доступными.

[0113] Нуклеиновые кислоты и клетки можно использовать для любых целей, например, для получения описанного здесь связывающего PD-1 агента. В этом отношении настоящее изобретение относится к способу получения связывающего PD-1 агента, включающему в себя культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептиды тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина связывающего PD-1 агента. Иначе говоря, способ включает экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую и/или легкую цепи иммуноглобулина связывающего PD-1 агента в клетке. Следует понимать, что тяжелая и легкая цепи иммуноглобулина могут быть экспрессированы из одной нуклеиновой кислоты в данной клетке, или тяжелая и легкая цепи иммуноглобулина могут быть экспрессированы из отдельных нуклеиновых кислот в одних и тех же клетках. Способ может дополнительно включать в себя сбор и/или очистку связывающего PD-1 агента из клеток или сред для культивирования клеток с использованием известных методов.

[0114] Следующие ниже примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, но,

конечно, не должны рассматриваться как каким-либо образом ограничивающие его объем.

Примеры

[0115] Следующие ниже примеры описывают конкретные последовательности полипептида тяжелой цепи и полипептида легкой цепи анти-PD-1 антитела в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. Антитела, используемые в этих примерах, указаны ниже.

[0116] Антитела 437M5-112 получали при помощи ПЦР с ДНК, полученной из одной клетки, на отсортированных, связывающих PD-1 IgG переключенных В-клетках из иммунизированной селезенки мыши. Антитела 3.7C6 получали из гибридомы мыши, полученной стандартными методами слияния из клеток селезенки иммунизированной мыши. Антитела гуманизировали с использованием описанных здесь стандартных методик. Конечные оптимизированные антитела экспрессировали в клетках CHO. Последовательности антител описаны в Таблицах 1A, 1B и 1C, где обозначения «H» и «L» относятся к тяжелой и легкой цепям соответственно, а CDR определены таким образом, что включают в себя аминокислоты в соответствии нумерацией по Кэботу и IMGT (Таблица 1B) или нумерацией по Кэботу или IMGT для определенных антител (Таблица 1C).

Таблица 1A

<u>АКА 437M5-112</u>	<u>Условия экспрессии</u>	<u>Варибельная область H цепи</u>	<u>Варибельная область L цепи</u>
APE12044		SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 35
APE11844		SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 34
APE12043	ExpiCHO-S™ транзиентная	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 35
APE12538	Сортированный стабильный пул CHO-S	SEQ ID NO: 29 (Полноразмерная H цепь SEQ ID NO: 36)	SEQ ID NO: 35 (Полноразмерная L цепь SEQ ID NO: 37)
<u>АКА 3.7C6</u>	<u>Условия экспрессии</u>	<u>Варибельная область H цепи</u>	<u>Варибельная область L цепи</u>
APE12093		SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 50
APE12095	ExpiCHO-S™ транзиентная	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 49
APE12537	Сортированный стабильный пул CHO-S	SEQ ID NO: 47 (Полноразмерная H цепь SEQ ID NO: 51)	SEQ ID NO: 49 (Полноразмерная L цепь SEQ ID NO: 52)
APE12890	CHO-S	SEQ ID NO: 47 (Полноразмерная H	SEQ ID NO: 49 (Полноразмерная L

		цепь SEQ ID NO: 51)	цепь SEQ ID NO: 52)
--	--	---------------------	---------------------

Таблица 1В

Антитело	Последовательности CDR (SEQ ID NO)					
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
APE12044	15	2	21	23	5	6
APE11844	13	2	19	22	5	6
APE12043	15	2	20	23	5	6
APE12538	15	2	20	23	5	6
APE12093	57	41	9	10	11	12
APE12095	57	42	9	10	11	12
APE12537	57	42	9	10	11	12
APE12890	57	42	9	10	11	12

Таблица 1С

3.7C6 (APE12095, APE12537, APE12890)	SEQ ID NO	Последовательность по Кэботу
CDRH1	64	DYSMH
CDRH2	65	WINIETYYPTYADQFKG
CDRH3	66	DYYGRFYAMDY
CDRL1	67	TASSSVSSSYFH
CDRL2	68	STSNLAS
CDRL3	69	HQYHRSPLT
3.7C6 (APE12095, APE12537, APE12890)		Последовательность по IMGT
CDRH1	70	NYTFTDYS
CDRH2	71	INIETYYP
CDRH3	72	ARDYYGRFYAMDY
CDRL1	73	SSVSSSY
CDRL2	74	STS
CDRL3	75	HQYHRSPLT
437M5 (APE12043 и APE12538)		Последовательность по Кэботу
CDRH1	76	SYSMH
CDRH2	77	YINPSSGFTNYIQKFRD
CDRH3	78	DYYGRYYYYVMDY

CDRL1	79	TASSSVSSSFLH
CDRL2	80	STSDLAS
CDRL3	81	HQYHRSPLT
437M5 (APE12043 и APE12538)		Последовательность по IMGT
CDRH1	82	GYTFTSYS
CDRH2	83	INPSSGFT
CDRH3	84	ARDYYGRYYYYVMDY
CDRL1	85	SSVSSSF
CDRL2	86	STS
CDRL3	87	HQYHRSPLT

Пример 1

[0117] Этот пример демонстрирует, что описанные здесь антитела проявляют насыщение связывания с PD-1 человека и яванского макака, экспрессируемым в стабильно трансфицированных клетках HEK 293.

[0118] Клетки HEK 293 стабильно трансфицировали для экспрессии PD-1 человека или PD-1 яванского макака. Клетки собирали обработкой Accutase™ (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA), клетки, экспрессирующие PD-1 яванского макака, обрабатывали липофильным флуоресцентным красителем Vybrant® DiD (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA), а затем смешивали с равным количеством немеченых клеток HEK 293, экспрессирующих человеческий PD-1. Клетки (всего 2×10^5 на образец) окрашивали указанными концентрациями каждого антитела в течение 40 мин при температуре 4°C при легком встряхивании, центрифугировали и один раз промывали. Клетки фиксировали в 2% параформальдегиде в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в течение 10 минут при комнатной температуре, промывали и выявляли антитела козьими антителами против каппы человека, конъюгированными с фикоэритрином (PE) (Southern Biotechnology, Birmingham, AL), в течение 15 минут при температуре 4°C при легком встряхивании. Клетки промывали, ресуспендировали и количественно определяли флуоресценцию связанного антитела на приборе BD FACSAarray™ (BD Biosciences, San Jose, CA). Данные анализировали на предмет средней интенсивности флуоресценции (СИФ) с использованием программного обеспечения для анализа FlowJo® (FlowJo, LLC). Значения EC₅₀ определяли в GraphPad Prism 5.0 (программное обеспечение GraphPad) с использованием логарифма агониста в сравнении с ответом - аппроксимация кривой с переменным наклоном (4 параметра). Результаты представлены на Фигурах 1 и 2, а значения EC₅₀ представлены в Таблице 2 (человек) и Таблице 3 (яванский макак). APE06339 представляет собой контрольное антитело изотипа IgG1 человека, специфичное к лизоциму куриного яйца. APE08145 является эталонным антителом против PD-1.

Таблица 2

Антитело	Тип	EC ₅₀ (нМ)
----------	-----	-----------------------

APЕ12043.02	437M5-112	4,88
APЕ12043.03	437M5-112	3,13
APЕ12043.05	437M5-112	2,95
APЕ12095.03	3,7С6	11,92
APЕ12095.04	3,7С6	9,04
APЕ12095.06	3,7С6	11,82
APЕ08145.05	Эталонное анти-PD1 антитело	20,80
APЕ08145.06	Эталонное анти-PD1 антитело	10,91
APЕ06339.08	Изотипический контроль IgG1	Нет связывания

Таблица 3

Антитело	Тип	EC ₅₀ (нМ)
APЕ12043.02	437M5-112	3,69
APЕ12043.03	437M5-112	2,69
APЕ12043.05	437M5-112	2,59
APЕ12095.03	3,7С6	7,99
APЕ12095.04	3,7С6	6,17
APЕ12095.06	3,7С6	7,47
APЕ08145.05	Эталонное анти-PD1 антитело	91,14
APЕ08145.06	Эталонное анти-PD1 антитело	65,68
APЕ06339.08	Изотипический контроль IgG1	Нет связывания

Пример 2

[0119] Этот пример демонстрирует, что описанные здесь антитела связываются с 2-дневными анти-CD3/анти-CD28 активированными CD4⁺ Т-клетками периферической крови человека.

[0120] Первичные CD4⁺ Т-клетки периферической крови человека получали при помощи разделения с использованием магнитных частиц (CD4⁺ Т Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec, Auburn, CA) моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) и активировали в течение 48 часов в покрытых анти-CD3 и анти-CD28 6-луночных пластиковых планшетах. Клетки (1×10⁵ на образец) промывали и окрашивали в 96-луночных планшетах с V-образным дном указанными концентрациями каждого антитела в течение 30 мин при температуре 4°C при легком встряхивании, центрифугировали и один раз промывали. Клетки фиксировали в 4% параформальдегиде в ФСБ в течение 10 мин при комнатной температуре, промывали и определяли антитела с помощью конъюгированного с Alexa Fluor 647 F(ab')₂ козьего антитела против человеческого IgG Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) в течение 10 минут при температуре 4°C. Клетки промывали, ресуспендировали и количественно определяли флуоресценцию связанного антитела на приборе BD FACSAarray™ (BD Biosciences, San Jose, CA). Данные

анализировали на предмет средней геометрической интенсивности флуоресценции (СИФ) с использованием программного обеспечения для анализа FlowJo® (FlowJo, LLC). Значения EC₅₀ определяли в GraphPad Prism 7.02 (программное обеспечение GraphPad) с использованием логарифма агониста в сравнении с ответом - аппроксимация кривой с переменным наклоном (4 параметра). Результаты показаны на Фигуре 3, а значения EC₅₀ представлены в Таблице 4. APE10787 представляет собой антитело положительного контроля IgG1 человека, специфичное в отношении PD-1, а APE06339 представляет собой антитело изотипического контроля IgG1 человека, специфичное в отношении лизоцима куриного яйца.

Таблица 4

Антитело	Описание	EC ₅₀ (нМ)
APE10787	Анти-PD-1 положительный контроль	0,36
APE06339.08	IgG1 Изотипический контроль	Нет связывания
APE12043.03	437M5-112	2,99
APE12043.05	437M5-112	3,06
APE12095.04	3,7C6	39,07
APE12095.06	3,7C6	53,87

Пример 3

[0121] В этом Примере показана степень, в которой описанные здесь антитела конкурируют с PD-L1 и PD-L2 за связывание с человеческими клетками CHO-K1, трансфицированными PD-1.

[0122] Анализ конкуренции проводили для проверки конкуренции за связывание с PD-1 между анти-PD-1 антителами и конструкциями PD-L1-Fc или PD-L2-Fc. Как показано на Фигурах 4-7, тестируемое антитело демонстрировало умеренную конкуренцию с PD-L1 (~70% максимального ингибирования) и сильную конкуренцию с PD-L2; Другое протестированное антитело показало слабую/минимальную конкуренцию с PD-L1 (~15% максимального ингибирования) и умеренную конкуренцию с PD-L2 (~70% максимального ингибирования).

[0123] Клетки CHO-K1 были стабильно трансфицированы для экспрессии человеческого PD-1, и был выбран клон с высоким уровнем экспрессии. Клетки собирали обработкой Accutase™ (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA) и помещали в 96-луночные планшеты с U-образным дном (2×10⁵ клеток на лунку). Для тестирования конкурирующие с PD-L1 антитела серийно разводили и предварительно смешивали с меченым DyLight 650 (DyL650) слитым белком человеческий PD-L1-мышинный IgG1 Fc (Abcam, Cambridge, MA) (конечная концентрация 10 нМ DyL650-PD-L1-Fc и концентрации антител указаны на Фигурах 4 и 5). После инкубации в течение 10 минут на льду смесь антитело/DyL650-PD-L1-Fc добавляли к клеткам на 30 минут при температуре 4°C при легком встряхивании. Клетки центрифугировали, один раз промывали, ресуспендировали в буфере, содержащем йодид пропидия, и флуоресценцию связанного

PD-L1-Fc определяли количественно на приборе BD FACSAarray™ (BD Biosciences, San Jose, CA). Данные анализировали на предмет средней геометрической интенсивности флуоресценции (СИФ) PD-L1 с использованием программного обеспечения для анализа FlowJo® (FlowJo, LLC). Значения IC₅₀ определяли в GraphPad Prism 7.02 (программное обеспечение GraphPad) с использованием логарифма агониста в сравнении с ответом - аппроксимация кривой с переменным наклоном (4 параметра). Результаты представлены на Фигурах 4 и 5, а полученные значения IC₅₀ представлены в Таблицах 4-5. APE10787 («10787») представляет собой антитело-антагонист положительного контроля IgG1 человека, специфичное в отношении PD-1, а APE06339 («06339.08») представляет собой антитело изотипического контроля IgG1 человека, специфичное в отношении лизоцима куриного яйца. APE08145 («08145.05» и «08145.06») является эталонным антителом. APE12043 («12043.02» и «12043.03») представляет собой анти-PD-1 антитело 437M5-112, описанное в Примере 1. APE12095 («12095.03» и «12095.04») представляет собой анти-PD-1 антитело 3.7C6, описанное в Примере 1.

[0124] Клон клеток CHO-K1, стабильно экспрессирующий высокие уровни PD-1 человека, собирали обработкой Accutase™ (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA) и помещали в 96-луночные планшеты с U-образным дном (2×10^5 клеток на лунку). Для тестирования конкурирующие с PD-L2 антитела серийно разводили и предварительно смешивали с DyL650-меченым слитым белком человеческий PD-L2-мышиний IgG1 Fc (Abcam, Cambridge, MA) (10 нМ конечная концентрация DyL650-PD-L2-Fc и концентрации антител указаны на Фигурах 6 и 7). После инкубации в течение 10 минут на льду смеси антитело/DyL650-PD-L2-Fc добавляли к клеткам на 30 минут при температуре 4°C при легком встряхивании. Клетки центрифугировали, промывали один раз, ресуспендировали в буфере, содержащем йодид пропидия, и флуоресценцию связанного PD-L2-Fc определяли количественно на приборе BD FACSAarray™ (BD Biosciences, San Jose, CA). Данные анализировали на предмет геометрической средней интенсивности флуоресценции (СИФ) PD-L2 с использованием программного обеспечения для анализа FlowJo® (FlowJo, LLC). Значения IC₅₀ определяли в GraphPad Prism 7.02 (программное обеспечение GraphPad) с использованием логарифма агониста в сравнении с ответом - аппроксимация кривой с переменным наклоном (4 параметра). Результаты представлены на Фигурах 6 и 7, а полученные значения IC₅₀ представлены в Таблицах 6-7. APE10787 («10787») представляет собой антитело-антагонист положительного контроля IgG1 человека, специфичное в отношении PD-1, а APE06339 («06339.08») представляет собой антитело изотипического контроля IgG1 человека, специфичное в отношении лизоцима куриного яйца. APE08145 («08145.05» и «08145.06») представляет собой эталонное антитело. APE12043 («12043.02» и «12043.03») представляет собой анти-PD-1 антитело 437M5-112, описанное в Примере 1. APE12095 («12095.03» и «12095.04») представляет собой анти-PD-1 антитело 3.7C6, описанное в Примере 1.

Таблица 4. Конкуренция PD-L1-Fc

Антитело	Тип	IC ₅₀ (нМ)
----------	-----	-----------------------

APЕ10787	Анти-PD-1 Положительный контроль	1,89
APЕ06339.08	IgG1 Изотипический контроль	Нет конкуренции
APЕ08145.05	Эталонное анти-PD-1 антитело	75,2
APЕ08145.06	Эталонное анти-PD-1 антитело	119,1
APЕ12043.02	437M5-11	11,6
APЕ12043.03	437M5-11	12,2

Таблица 5. Конкуренция PD-L1-Fc

Антитело	Тип	IC ₅₀ (нМ)
APЕ10787	Анти-PD-1 Положительный контроль	1,59
APЕ06339.08	IgG1 Изотипический контроль	Нет конкуренции
APЕ12095.03	3.7C6	495,1
APЕ12095.04	3.7C6	632,1

Таблица 6. Конкуренция PD-L2-Fc

Антитело	Тип	IC ₅₀ (нМ)
APЕ10787	Анти-PD-1 Положительный контроль	2,53
APЕ06339.08	IgG1 Изотипический контроль	Нет конкуренции
APЕ08145.05	Эталонное анти-PD-1 антитело	Нет конкуренции
APЕ08145.06	Эталонное анти-PD-1 антитело	Нет конкуренции
APЕ12043.02	M5-11	5,8
APЕ12043.03	M5-11	5,5

Таблица 7. Конкуренция PD-L2-Fc

Антитело	Тип	IC ₅₀ (нМ)
APЕ10787	Анти-PD-1 Положительный контроль	1,78
APЕ06339.08	IgG1 Изотипический контроль	Нет конкуренции
APЕ12095.03	3.7C6	30,4
APЕ12095.04	3.7C6	20,0

Пример 4

[0125] В этом Примере показано, что описанные здесь антитела проявляют устойчивую агонистическую активность в анализах с нанесенными на гранулы и планшеты агонистами.

[0125] Для анализа агонистической активности на основе гранул гранулы Dynabeads® M-280 Tosylactivated (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA) соединяли в соответствии с инструкциями производителя с анти-CD3 антителом (10 мкг), анти-PD-1 антителом или PD-L1-Fc (40 мкг), и антителом связывающим лизоцим куриного яйца (50 мкг), в качестве отрицательного контроля, общее количество связанного белка составляло 100 мкг. Степень связывания гранул количественно оценивали с помощью проточной

цитометрии. Первичные CD4⁺ Т-клетки периферической крови человека получали при помощи разделения с использованием магнитных частиц (CD4⁺ Т Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec, Auburn, CA) МКПК. Очищенные CD4⁺ Т-клетки (1×10^5 клеток на лунку) инкубировали с различным количеством гранул, как указано, (соотношение гранулы:Т-клетки 4:1, 2:1 или 1:1) в присутствии растворимого анти-CD28 антитела. (eBioscience; 250 нг/мл, 100 нг/мл или 50 нг/мл, как указано) в течение 72 часов. Секретируемый IFN γ в культуральных супернатантах количественно определяли с помощью твердофазного ИФА (R&D Systems, Minneapolis, MN). Как показано на Фигуре 8А и 8В и в Таблице 8, описанные здесь анти-PD-1 антитела (437M5-112 и 3.7C6), продемонстрировали устойчивую ингибирующую (агонистическую) активность в тесте с использованием гранул, которая была сопоставима с активностью PD-L1-Fc.

[0127] Как показано на Фигурах 9А-9С, варианты APE12093 и APE12095 3.7C6 были лучшими агонистами в анализе на основе гранул с более сильным ингибированием по сравнению с PD-L1-Fc. Варианты 437M5-112 APE12043 и APE12044 обладали улучшенной агонистической активностью по сравнению с исходным антителом APE11844.

Таблица 8

Кандидатное антитело	Количество протестированных доноров	% Ингибирования IFNγ (Среднее \pm СКО)
437M5-112 (APE12043)	7	83 \pm 6
3.7C6 (APE12095)	6	77 \pm 7
PD-L1-Fc	10	83 \pm 3

[0128] Ингибирование продуцирования IFN γ описанными здесь анти-PD-1 антителами у доноров, протестированных в анализе агонистической активности на основе гранул, показано на Фигурах 10А-10В и Фигурах 11А-11С.

[0129] Для анализов агонистической активности с использованием планшетов 96-луночные планшеты последовательно покрывали анти-CD3 антителом (0,3 мкг/мл) в течение ночи при температуре 4 $^{\circ}$ С, лунки аспирировали и промывали ФСБ, а затем подвергали второму покрытию в течение ночи при температуре 4 $^{\circ}$ С различными концентрациями анти-PD-1 антитела или PD-L1-Fc, как показано на Фигурах 12-14. Свежие или замороженные МКПК человека культивировали в присутствии фитогемагглютинаина (РНА; 2 мкг/мл) в течение 48 часов, собирали, промывали для удаления РНА и культивировали в течение ночи в присутствии IL-2. Клетки собирали, промывали и инкубировали в лунках, покрытых анти-CD3 антителом/анти-PD-1 антителом (1×10^5 клеток на лунку) в присутствии гамма-глобулина человека (100 мкг/мл) в течение 48 часов. Секретируемый IL-2 в супернатантах культур количественно определяли с помощью твердофазного ИФА (R&D Systems, Minneapolis, MN). Ингибирование продуцирования IL-2 анти-PD-1 антителами у трех доноров МКПК

показано на Фигурах 12А-12В, 13А-13В и 14А-14В. Ингибирование продуцирования ИЛ-2 описанными здесь анти-PD-1 антителами было сравнимо с ингибированием, индуцированным PD-L1-Fc.

Пример 5

[0130] В этом Примере показано, что описанные здесь анти-PD-1 антитела проявляют активность агонистических антител в растворе в присутствии блокирующих анти-PD-1/анти-PD-L2 антител.

[0131] Цельную кровь от доноров, иммунизированных столбнячным анатоксином, разводили в соотношении 1:3 и культивировали в течение 4 дней в 96-луночных планшетах с U-образным дном в присутствии столбнячного анатоксина (Astarte Biologics, Bothell, WA; 5 мкг/мл), анти-PD-L1+анти-PD-L2 антител (BioLegend, San Diego, CA; по 2 мкг/мл каждого) и указанных концентраций тетрамерного PD-L1-Fc, анти-PD-1 IgG1 антител, описанных здесь (3.7C6 APE12095; 437M5-112 APE12043) или контрольного человеческого IgG1. Секретируемый IFN γ в культуральных супернатантах количественно определяли с помощью твердофазного ИФА (R&D Systems, Minneapolis, MN). В этом анализе цельной крови ответа на столбнячный анатоксин сильная агонистическая активность анти-PD-1-антител, описанных здесь, наблюдалась в присутствии блокирующих анти-PD-L1/анти-PD-L2 антител, как показано на Фигуре 15А (положительный результат и отрицательные контроли) и 15В (анти-PD-1-антитела).

[0132] Анти-PD-1 антитело IgG1 3.7C6 сравнивали с таким же антителом, полученным как человеческий IgG2 (Фигуры 15С и 15D). Вариант анти-PD-1 антитела IgG2 имел такое же связывание с активированными Т-клетками, что и анти-PD-1 IgG1, но не проявлял агонистической активности. Изоотипы антитела IgG2, IgG4 или IgG1 (L234А, L235А) также не обладали агонистической активностью, что демонстрирует необходимость вовлечения Fc γ R/кластеризации антител для функциональной агонистической активности.

Пример 6

[0133] В этом Примере показано, что описанные здесь анти-PD-1 антитела снижают иммунный ответ в цельной крови зависимым от концентрации образом.

[0134] Цельная кровь человека, стимулированная подходящим антигеном *in vitro*, будет вызывать специфичный вторичный иммунный ответ Т-клеток, когда донор ранее испытал воздействие исследуемого антигена. Иммунный ответ можно оценить по уровням IFN- γ и ИЛ 17А.

[0135] Здоровых доноров-людей (N=6) предварительно проверяли *in vitro* на вторичный иммунный ответ к антигену столбнячного анатоксина, воздействию которому доноры, вероятно, ранее подвергались в ходе вакцинации против столбняка. Цельную кровь от доноров культивировали в течение 96 часов в присутствии столбнячного анатоксина и либо анти-PD-1 антитела 3.7C6 (APE12890), либо нерелевантного человеческого IgG1 в качестве изотипического контроля. После 96 часов культивирования супернатант анализировали на присутствие цитокинов IFN- γ и ИЛ 17А с использованием

наборов для определения цитокинов (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD). Результаты представлены на Фигурах 22А и 22В.

[0135] Все доноры ответили на стимуляцию, специфичную для столбнячного анатоксина, продуцированием значительных количеств IFN- γ и IL-17A, хотя некоторые доноры ответили более сильно, чем другие. Антитело 3.7С6 снижает секрецию как IFN- γ , так и IL-17A в зависимости от концентрации по сравнению с антителом изотипического контроля IgG1, как показано на Фигурах 22А и 22В. Медианная IC₅₀ и средняя IC₅₀ \pm CO 3,7С6 в анализе ответа на столбнячный анатоксин цельной крови человека были определены как 0,053 нМ и 0,091 \pm 0,115 нМ, соответственно для ингибирования IFN- γ , и 0,097 нМ и 0,119 \pm 0,098 нМ, соответственно, для ингибирования IL-17A.

Пример 7

[0137] В этом Примере показана кинетика связывания (аффинности) и термостабильность описанных здесь антител.

[0138] Антитело 3.7С6 (APE12095.06 и APE12537.01) показало сравнимую кинетику связывания по данным поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с PD-1 человека и яванского макака. Кинетика плотного связывания приблизилась к пределам обнаружения прибора. Данные SPR хорошо согласуются с аффинностями равновесного связывания для APE12095, определенными с помощью анализа кинетического исключения (KinExA®). Окончательные измерения аффинности были следующими: KinExA® K_D для человеческого PD-1: 75 пМ; и KinExA® K_D для PD-1 яванского макака: 450 пМ.

[0139] Антитело 437M5-112 (APE12043.05 и APE12538.01) также показало в значительной степени сравнимую кинетику связывания по данным SPR с PD-1 человека и яванского макака. Кинетика плотного связывания к пределам обнаружения прибора. Данные SPR хорошо согласуются с аффинностями равновесного связывания для APE12043, определенными с помощью KinExA®. Окончательные измерения аффинности были следующими: KinExA® K_D для человеческого PD-1: 51 пМ; и KinExA® K_D для PD-1 яванского макака: 210 пМ. Обобщенные результаты измерений K_D для описанных здесь анти-PD-1 антител с помощью поверхностного плазмонного резонанса и KinExA®, приведены в Таблице 9.

Таблица 9

Антитело/партия	K _D PD-1 человека (SPR)	K _D PD-1 макака (SPR)	K _D PD-1 человека (KinExA)	K _D PD-1 макака (KinExA)
APE12043.05	31 пМ	90 пМ		
APE12538.01	51 пМ	217 пМ		
APE12043.04			51 пМ	210 пМ
APE12095.06	51 пМ	244 пМ		
APE12537.01	43 пМ	445 пМ		

АРЕ12095.04			75 пМ	450 пМ
-------------	--	--	-------	--------

[0140] Аффинность связывания и термостабильность антитела АРЕ12537 сравнивали с этими показателями у аналогичного антитела, обозначенного «030-13263/030-13264». АРЕ12537 отличается от 030-13263/030-13264 двумя мутациями в тяжелой цепи: А52аI и D62Q по нумерации Кэбота (А53I и D63Q с использованием положений в списке последовательностей). Результаты, представленные в Таблице 10, показывают, что эти мутации увеличивают аффинность связывания и термостабильность.

Таблица 10

<u>Антитело</u>	<u>Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID)</u>	<u>Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID)</u>	<u>K_D PD-1 человека (нМ)</u>	<u>K_D PD-1 макака (нМ)</u>	<u>Fab T_m (°C)</u>
Химерное мышинное	--	--	4,3	н.о.	н.о.
030-13263/ 030-13264 (с привитыми CDR)	43	49	0,186	1,02±0,08 N=2	61,2±0,3 N=3
АРЕ12537 (с привитыми CDR и оптимизированное)	47	49	0,060	0,64±0,10 N=2	66,1

[0141] Измерения K_D для скрининга с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) проводили на приборе Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA), и кинетические константы согласовывались в глобальном масштабе с использованием модели связывания 1:1. Биотинилированный мономер внеклеточного домена PD-1 человека или яванского макака захватывали в концентрации 1 нМ на сенсорном чипе Biacore Sensor chip SA (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA) с поверхностью из карбоксиметилированного декстрана, предварительно иммобилизованной стрептавидином. Уровень захваченного антигена был нацелен на получение низкого ответа для предотвращения влияния avidности на скорость диссоциации. Измерения T_m проводили с помощью теплового сдвига на основе флуоресценции и дифференциальной сканирующей калориметрии.

Пример 8

[0142] В этом Примере показано, что описанные здесь анти-PD-1 антитела проявляют эффективность *in vivo* в ксеногенной модели NSG/Hu-PBMC реакции

«трансплантат против хозяина» (РТПХ).

[0143] Ксеногенная модель NSG/Hu-PBMC РТПХ, тестирующая эффективность описанных здесь анти-PD-1 антител, была создана в The Jackson Laboratory JAX® In vivo Pharmacology Services (Sacramento, CA). Мышей NOD-scid IL2 γ ^{null} (NSG) облучали 1 Гр с последующей внутривенной инъекцией 3×10^6 человеческих МКПК каждой мыши, как показано на Фигуре 16А. Антитела вводили внутривенно в дозе 10 мг/кг дважды в неделю в течение 4 недель, начиная со следующего дня после инъекции МКПК, а биоаналог белатасепта вводили внутривенно в дозе 75 мкг/мышь три раза в неделю в течение 4 недель. Режимы дозирования и группы дозирования в исследовании показаны на Фигуре 16В. Заболевание контролировали три раза в неделю по показателям потери веса, смерти и РТПХ, измеряя: потерю веса, активность, текстуру меха, бледность и положение тела. У животных, демонстрирующих потерю массы тела более чем 10%, заболевание контролировали ежедневно, и животных, демонстрирующих потерю массы тела более чем 20% от начальной массы, умерщвляли.

[0144] Описанное здесь анти-PD-1 агонистическое антитело 3.7C6 (APE12095) показало статистически значимую эффективность по сравнению с изотипическим контролем во времени до потери 10% массы тела (Фигура 16С). Описанное здесь анти-PD-1 агонистическое антитело 437M5-112 также показало статистически значимую эффективность по сравнению с изотипическим контролем во времени до потери 10% массы тела (Фигура 16D). Ответы на оба анти-PD-1 антитела были бимодальными, при этом часть животных в каждой группе полностью выжила в исследовании (Фигуры 16С и 16D).

Пример 9

[0145] В этом Примере показан дизайн исследования фармакокинетики и переносимости однократной дозы у яванского макака.

[0146] Дизайн исследования фармакокинетики и переносимости однократной дозы у яванского макака представлен в Таблице 11. Оценки во время исследования были следующими:

Клиническая патология, перед введением дозы (дважды), дни 2, 6, 22 и 35 (Charles River Laboratories (CRL))

Панели FACS крови - основные популяции лейкоцитов и 20 субпопуляций Т-лимфоцитов, перед введением дозы (дважды), дни 2, 6, 22 и 35 (CRL)

- В-клетки, Т-клетки, НК-клетки, моноциты

- CD4, CD8, центральные Т-клетки памяти, эффекторные Т-клетки памяти, PD-1⁺, активированные CD4⁺ и CD8⁺, Treg

Занятость рецептора, дни 4, 14, 28, 35

Фармакокинетический анализ проб, анализ антител к лекарственным препаратам перед введением дозы и на день 35

Анализ цитокинов сыворотки крови (17 цитокинов: IL-1 β , IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-13, IL-17a, ГМКСФ, ГМ-КСФ, IFN γ , MIP1 β , MIP1 α , TNF- α),

перед введением дозы, 4 часа и 24 часа, дни 7 и 35

Анализ фармакокинетических параметров РК с использованием Phoenix® WinNonlin® (Certara, США).

[0147] Оба анти-PD-1 антитела показали хорошие фармакокинетические свойства с обнаруживаемыми уровнями лекарственного средства у всех животных на 28 день (Фигуры 17А и 17В). Исследование было завершено на 35-й день. Дозы хорошо переносились, без каких-либо неблагоприятных клинических признаков или изменений клинической патологии. Результаты исследования представлены в Таблицах 11 и 12.

Таблица 11. Дизайн исследования фармакокинетики и переносимости однократной дозы на яванских макаках

Группа	Доза (мг/кг)	Кол-во самцов животных	Тестируемый препарат	Путь введения
1	10	3	437M5-112 стабильный СНО-S пул	Внутривенно (в.в.)
2	10	3	437M5-112 стабильный СНО-S пул	Подкожно (п.к.)
3	10	3	3.7C6 стабильный СНО-S пул	Внутривенно (в.в.)
4	10	3	3.7C6 стабильный СНО-S пул	Подкожно (п.к.)

Таблица 12. Анализ фармакокинетических параметров, цитокинов и ответов антител против лекарственных средств

Параметр*	Единицы	в.в. (Группа 1)	п.к. (Группа 2)	в.в. (Группа 3)	п.к. (Группа 4)
Время полужизни	ч	63,1 (11,6)	91,3 (4,9)	127,9 (7,4)	115,2 (57,8)
Tmax†	ч	0,67 (0,29)	37,67 (22,2)	0,50 (0)	28,83 (19,70)
Cmax	нг/мл	417,616 (62,049)	51,210 (4,163)	342,115 (31,785)	46,365 (14,645)
C0	нг/мл	439,299 (15,116)		392234 (36,564)	
AUCall	ч*нг/мл	13,422,916 (2,068,923)	8,265,256 (353,998)	12,199,665 (2,639,065)	8,518,430 (1,899,319)
AUCINF_obs	ч*нг/мл	13,473,226 (2,100,523)	8,272,411 (357,502)	12,263,340 (2,686,651)	8,621,009 (1,985,163)

Cavg	нг/мл	16,043 (2,499)	9,840 (421)	14,536 (3,128)	10,1412 (2,260)
CLss или CL/F	мл/ч/кг	0,753 (0,108)	1,211 (0,052)	0,842 (0,163)	1,22 (0,31)
Vz или Vz/F	мл/кг	69,8 (21,3)	159,3 (5,7)	154,3 (22,3)	185,6 (65,6)
Vss_obs	мл/кг	55,7 (18,9)		98,7 (15,4)	
F	%		61,4		70,3

* Средние значения (\pm стандартное отклонение (CO)), 3 животных в группе. † Tmax, время до Cmax; Cmax, максимальная концентрация; C0 - начальная концентрация; AUCall, площадь под кривой до последнего наблюдения; AUCINF_obs, AUC до бесконечности на основе последнего наблюдения; Cavg, средняя концентрация; CLss, клиренс в стабильном состоянии; Vz - конечный фазовый объем распределения; Vss obs, объем распределения в стабильном состоянии на основе последнего наблюдения; F, процент биодоступности.

Таблица 13. Анализ ответов антител против лекарственных средств (ADA) и цитокинов

Животное	Антитело APE12538.01 Когорта	Перед введением дозы ADA	День 36 ADA	День 36 ADA Титр
1001	10мг/кг в.в.	Отрицательный	Положительный	320
1002	10мг/кг в.в.	Отрицательный	Положительный	80
1003	10мг/кг в.в.	Отрицательный	Положительный	320
2001	10мг/кг п.к.	Отрицательный	Положительный	20
2002	10мг/кг п.к.	Отрицательный	Положительный	320
2003	10мг/кг п.к.	Отрицательный	Положительный	20
Животное	Антитело APE12537.01 Когорта	Перед введением дозы ADA	День 36 ADA	День 36 ADA Титр
3001	10мг/кг в.в.	Отрицательный	Отрицательный	
3002	10мг/кг в.в.	Отрицательный	Отрицательный	
3003	10мг/кг в.в.	Отрицательный	Положительный	64
4001	10мг/кг п.к.	Отрицательный	Отрицательный	
4002	10мг/кг п.к.	Отрицательный	Отрицательный	
4003	10мг/кг п.к.	Отрицательный	Положительный	128

[0148] Как показано, все 6 животных, которым вводили дозу антитела APE12538.01, имели измеряемый/низкий титр антител против лекарственного средства на

36-й день. Два из 6 животных, которым вводили дозу антитела APE12537.01, имели измеряемый/низкий титр антител против лекарственного средства на 36-й день. Не было никаких значимых изменений ни в одном из оцениваемых цитокинов. Далее, как показано на Фигурах 18А и 18В, устойчивая занятость рецептора до дня 14 наблюдалась у всех животных, кроме #1001 (которому 437М5-112 вводили внутривенно); некоторая занятость была обнаружена у большинства животных до 28 дня.

Пример 10

[0148] В этом примере показано, что описанное здесь анти-PD-1 антитело индуцировало рекрутирование фосфатазы SHP2 в цитоплазматический домен PD-1 в клетках Jurkat, трансфицированных PD-1.

[0150] Антитело 3.7С6 (APE12890) или контрольное антитело изотипа IgG1 человека, распознающее лизоцим куриного яйца и постоянное количество анти-CD3 антител (клон UCНТ1; BioLegend, San Diego, CA), были связаны с магнитными гранулами (Dynabeads™ M-280 тозиллированные; Invitrogen™/ThermoFisher Scientific). Анти-PD-1 антитело на гранулах имитирует захват FcγR антителом на антигенпрезентирующих клетках. Стабильные трансфицированные человеческим PD-1 клетки Jurkat стимулировали указанными гранулами либо в течение 2 минут, либо в течение 10 минут, клетки лизировали и PD-1 иммунопреципитировали добавлением гранул, связанных с 3.7С6. Иммунопреципитаты анализировали с помощью SDS-ПААГ с последующим иммуноблоттингом с анти-PD-1 (Фигура 19А, вверху), анти-SHP2 (Фигура 19А, в середине) или анти-SHP1 (Фигура 19А, внизу) антителами. В этом анализе передачи сигналов после активации клеток PD-1 Jurkat анти-CD3 антитело 3.7С6, описанное здесь, но не антитело изотипического контроля, индуцировало рекрутирование фосфатазы SHP2, но не SHP1, в цитоплазматический домен PD-1, как показано на Фигурах 19А (иммуноблот) и 19В (количественная денситометрическая оценка иммуноблоттинга). В присутствии гранул, покрытых анти-CD3 антителом, антагонистическое анти-PD-1 антитело ниволумаб (используемое в концентрации 100 нМ в растворе) не индуцировало рекрутирование SHP2 или SHP1 на PD-1, как показано на Фигуре 19А-В. При использовании растворимого ниволумаба не было обнаружено рекрутирования SHP. В сочетании с активацией Т-клеток и костимуляцией CD28 антитело 3.7С6 также снижает фосфорилирование ZAP70 и LAT (данные не показаны). Антитело 3.7С6 не влияло на сигнальные пути в отсутствие активации Т-клеток.

Пример 11

[0151] В этом Примере показано, что эпитоп на PD-1 человека, который связывается с описанным здесь антителом 3.7С6, находится на противоположной от сайта связывания PD-L1 стороне PD-1.

[0152] Картирование водородно-дейтериевого обмена пептидов на PD-1, связанных антителом 3.7С6 (APE12537), описанным здесь, проводили в компании Biomotif AB (Danderyd, Швеция) с использованием мономера рекомбинантного PD-1 человека. Структура PD-1 находится в открытом доступе в Базе данных структуры белков (Protein

Data Bank (PDB)), курируемой Национальным центром биотехнологической информации (NCBI) (Bethesda, MD) под регистрационным номером 4ZqK (см. также Zak, K. M. et al., 2015, Structure 23:2341-2348); и регистрационным номером PDB 5GGR (см. также Lee, J. Y. et al., 2016, Nat Commun., 7: 13354). Один основной пептид, обозначенный как «β-шпилька с картированным HDX», на Фигуре 20А и 20В, был защищен от водород-дейтериевого обмена антителом 3.7С6. «β-шпилька с картированным HDX» состояла из аминокислот 96-110 PD-1, которые представляют собой последовательность RVTQLPNGRDFHMSV. Другой основной пептид состоял из аминокислот 33-41 PD-1, аминокислоты которого представляют собой последовательность NPPTFSPAL. На Фигуре 20А и 20В показана ленточная модель кристаллической структуры внеклеточного домена PD-1 человека (черный), совмещенная с пространственной моделью кристаллической структуры внеклеточного связывающего домена PD-L1 человека (светло-серый) (структуры PD-1 и PD-L1 из NCBI PDB). Молекулы ориентированы так, что ближняя к мембране область PD-1 расположена слева внизу (Фигура 20А) и повернута на 90°, показывая ближнюю к мембране область PD-1 в центре внизу (Фигура 20В). Мономеры PD-1 человека, содержащие различные наборы мутаций в определенных областях поверхности, были экспрессированы, и связывание антитела 3.7С6 (APE12095), описанного здесь, оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Мутации в области, обозначенной «тройной точечный мутант PD-1» на Фигуре 20А и 20В, полностью аннулировали связывание описанного здесь антитела 3.7С6. Мутации в верхней части петли, обозначенной как «β-шпилька с картированным HDX» на Фигуре 20А и 20В, не влияли на связывание описанного здесь антитела 3.7С6. Комбинация водород-дейтериевого обмена и картирования мутаций PD-1 показала, что описанное здесь агонистическое анти-PD-1 антитело 3.7С6 демонстрирует связывание с областью, обозначенной на Фигуре 20В пунктирным кружком, которая находится на противоположной от сайта связывания PD-L1 стороне PD-1.

Пример 12

[0153] В этом Примере показано, что описанное здесь анти-PD-1 антитело ингибировало продуцирование $IFN\gamma$ в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) от доноров очаговой алопеции, стимулированных пептидными антигенами кератиноцитов.

[0154] Очаговой алопеция представляет собой выпадение волос, опосредованное иммунной системой. Выпадение волос возникает, когда иммунная привилегия волосяного фолликула нарушается кератиноцитами и антигенспецифичными Т-клетками меланоцитов, продуцирующими $IFN\gamma$. Т-клетки проникают в корневую оболочку волосяного фолликула. Активированные Т-клетки продуцируют избыточное количество $IFN\gamma$. Молекулы классов I и II главного комплекса гистосовместимости экспрессируются ненормально, что приводит к последующему разрушению клеток волосяных фолликулов и выпадению волос.

[0155] МКПК выделяли из крови доноров с очаговой алопецией и культивировали

(2×10^5 клеток на лунку) в планшетах в присутствии пептидных антигенов кератиноцитов (пулы пептидных антигенов были такими, как описано в Wang et al., *J Invest Dermatol.* 2016 Aug; 136(8): 1617-1626), и указанных концентраций тетрамера PD-L1-IgG1 Fc, анти-PD-1 антитела IgG1 3.7C6 (APE12890), или тетрамера IgG1 изотипического контроля, или IgG1 изотипического контроля. Через пять дней клетки промывали и инкубировали еще 20 часов в планшете ELISpot для определения количества клеток, секретирующих IFN γ . Результаты от каждого донора и группы лечения были нормализованы к необработанным лункам, чтобы позволить статистическое сравнение данных от 12 доноров для лечения и отрицательных контролей.

[0156] Как показано на Фигуре 21А, анти-PD-1 антитело IgG1 3.7C6 по сравнению с антителом IgG1 изотипического контроля ингибировало продуцирование IFN γ зависимым от концентрации образом. Как показано на Фигуре 21В, тетрамер PD-L1-IgG1 Fc положительного контроля по сравнению с тетрамером IgG1 изотипического контроля ингибировал продуцирование IFN γ по сравнению с тетрамером IgG1 изотипического контроля зависимым от концентрации образом. Как анти-PD-1 антитело, описанное здесь, так и тетрамер PD-L1-IgG1 Fc значимо ингибировали количество клеток, секретирующих IFN γ , при концентрациях 1 нМ или выше ($p < 0,001$), как показано на Фигурах 21С и 21D.

Пример 13

[0157] В этом Примере показано, что описанное здесь анти-PD-1 антитело ингибировало продуцирование IFN γ в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) от доноров очаговой алопеции, стимулированных пептидными антигенами меланоцитов.

[0158] Очаговая алопеция представляет собой выпадение волос, опосредованное иммунной системой. Выпадение волос и/или потеря пигментации волос возникает, когда иммунная привилегия волосяного фолликула нарушается кератиноцитами и антигенспецифичными Т-клетками меланоцитов, продуцирующими IFN γ . Т-клетки проникают в корневую оболочку волосяного фолликула. Активированные Т-клетки продуцируют избыточное количество IFN γ . Молекулы классов I и II главного комплекса гистосовместимости экспрессируются ненормально, что приводит к последующему разрушению клеток волосяных фолликулов и выпадению волос. Подобный меланоцит-специфичный Т-клеточный ответ в коже приводит к разрушению меланоцитов при витилиго.

[0159] МКПК выделяли из крови доноров с очаговой алопецией и культивировали (2×10^5 клеток на лунку) в планшетах в присутствии пептидных антигенов меланоцитов (пулы пептидных антигенов были такими, как описано в Wang et al., *J Invest Dermatol.* 2016 Aug 136 (8): 1617-1626), и указанных концентраций тетрамера PD-L1-IgG1 Fc, анти-PD-1 антитела IgG1 3.7C6 (APE12890), или тетрамера IgG1 изотипического контроля, или IgG1 изотипического контроля. Через пять дней секретируемый IFN γ в супернатантах культур количественно определяли в компании Meso Scale Discovery (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD). Результаты от каждого донора и лечения были нормализованы

для необработанных лунок, чтобы позволить статистическое сравнение данных от 12 доноров для лечения и отрицательных контролей. Кроме того, через 5 дней клетки промывали и инкубировали в течение дополнительных 20 часов в анализе ELISpot для определения количества клеток, секретирующих IFN γ . Результаты от каждого донора и лечения были нормализованы для необработанных лунок, чтобы позволить статистическое сравнение данных от 12 доноров для лечения и отрицательных контролей. Результаты представлены на Фигурах 23А-23D.

[0160] Как показано на Фигуре 23А, анти-PD-1 антитело IgG1 3.7C6 по сравнению с антителом IgG1 изотипического контроля ингибировало продуцирование IFN γ зависимым от концентрации образом. Как показано на Фигуре 23В, тетрамер PD-L1-IgG1 Fc положительного контроля по сравнению с тетрамером IgG1 изотипического контроля ингибировал продуцирование IFN γ по сравнению с тетрамером IgG1 изотипического контроля зависимым от концентрации образом. Как анти-PD-1 антитело, описанное здесь, так и тетрамер PD-L1-IgG1 Fc значимо ингибировали продуцирование IFN γ при концентрациях 100 нМ или выше ($p < 0,001$). Как анти-PD-1 антитело, описанное здесь, так и тетрамер PD-L1-IgG1 Fc значимо снижали количество клеток, секретирующих IFN γ , при концентрациях 10 нМ или выше ($p < 0,001$), как показано на Фигурах 23С и 23D.

Пример 14

[0161] В этом Примере показано, что описанное здесь анти-PD-1 антитело проявляет эффективность *in vivo* в ксеногенной модели NSG/Hu-PBMC реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) при дозировке 3 мг/кг.

[0162] Ксеногенная модель NSG/Hu-PBMC РТПХ, тестирующая эффективность описанных здесь анти-PD-1 антител, была создана в The Jackson Laboratory Sacramento, CA. Мышей NOD-scid IL2 γ^{null} (NSG) облучали 1 Гр с последующей внутривенной инъекцией $0,9 \times 10^7$ человеческих МКПК каждой мыши, как показано на Фигуре 24А. Антитела вводили внутривенно в дозе 30 мг/кг, 10 мг/кг или 3 мг/кг дважды в неделю в течение 4 недель, начиная со следующего дня после инъекции МКПК. Четвертой группе вводили дозу нерелевантного антитела изотипического контроля в дозе 30 мг/кг два раза в неделю, а пятой группе вводили дозу CTLA-4-IgG, известного положительного контроля эффективности в модели, в дозе 75 мкг/мышь три раза в неделю. Режимы дозирования и группы доз в исследовании показаны на Фигуре 24В. Заболевание контролировали три раза в неделю по показателям потери веса, смерти и РТПХ, измеряя: потерю веса, активность, текстуру меха, бледность и положение тела. У животных, демонстрирующих потерю массы тела более чем 10%, заболевание контролировали ежедневно, и животных, демонстрирующих потерю массы тела более чем 20% от начальной массы, умерщвляли.

[0163] Описанное здесь агонистическое анти-PD-1 антитело 3.7C6 (APE12890) показало статистически значимую эффективность по сравнению с изотипическим контролем в отношении выживаемости, увеличивая среднее время выживания (Фигура 24С). Процентное соотношение исходной массы тела отдельных животных в ходе исследования показано на Фигурах 24D, 24Е, 24F, 24G и 24H при введении

изотипического контроля IgG1 в дозе 30 мг/кг, агонистического анти-PD-1 IgG1 (3.7C6) в дозе 30 мг/кг, агонистического анти-PD-1 IgG1 (3.7C6) в дозе 10 мг/кг, агонистического анти-PD-1 IgG1 (3.7C6) в дозе 3 мг/кг и CTLA-4-Ig (положительный контроль) 75 мкг на дозу, соответственно.

[0164] Не было значимого различия в выживаемости между группами, получавшими дозу 30 мг/кг агонистического анти-PD-1 IgG1 (3,7C6) и 3 мг/кг агонистического анти-PD-1 IgG1 (3,7C6). Это свидетельствует о том, что эффективность в модели РТПХ может быть достигнута при дозах менее 3 мг/кг.

[0165] Все ссылки, включая публикации, заявки на патенты и патенты, процитированные в здесь, тем самым включены в настоящее изобретение путем ссылки в той же степени, как если бы каждая ссылка была индивидуально и конкретно указана для включения в качестве ссылки и была изложена здесь во всей полноте.

[0166] Использование терминов в форме единственного числа и с указанием «по меньшей мере один» и подобных указаний в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения) должно толковаться как включающее в себя как единственное, так и множественное число, если иное не указано в настоящем описании или явно не противоречит контексту. Использование термина «по меньшей мере один», за которым следует список из одного или нескольких элементов (например, «по меньшей мере один из А и В»), должно толковаться как означающее один элемент, выбранный из перечисленных элементов (А или В) или любое сочетание двух или более из перечисленных элементов (А и В), если иное не указано в настоящем описании или явно не противоречит контексту. Термины «содержащий», «имеющий», «включающий» и «включающий» следует толковать как неограниченные термины (т.е. означающие «включая, но без ограничений»), если не указано иное. Перечисление диапазонов значений в настоящем изобретении просто предназначено для использования в качестве сокращенного метода индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в этот диапазон, если здесь не указано иное, и каждое отдельное значение включено в настоящее изобретение, как если бы оно было отдельно указано в настоящем изобретении. Все способы, описанные в настоящем изобретении, могут выполняться в любом подходящем порядке, если иное не указано в настоящем описании или иным образом явно не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или вводных слов перед примером (например, «такой как»), имеющее место в настоящем описании, предназначено просто для лучшего пояснения изобретения и не налагает ограничения на объем изобретения, если не заявлено иное. Никакие формулировки в описании не следует истолковывать как указывающие на какой-либо не заявленный элемент как существенный для практического осуществления настоящего изобретения.

[0167] Предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения описаны здесь, включая лучший способ осуществления изобретения, известный авторам настоящего изобретения. Вариации этих предпочтительных вариантов осуществления изобретения могут стать очевидными для специалистов в данной области техники после

прочтения предшествующего описания. Авторы настоящего изобретения ожидают, что специалисты в данной области техники будут использовать такие вариации в зависимости от обстоятельств, и авторы настоящего изобретения предполагают, что изобретение будет реализовано на практике иначе, чем конкретно описано здесь. Соответственно, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, изложенного в прилагаемой формуле изобретения, как это разрешено применимым законодательством. Более того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех их возможных вариациях охватывается изобретением, если иное не указано в настоящем описании или иным образом явно не противоречит контексту.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Анти-PD-1 связывающий агент, содержащий переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина и переменную область легкой цепи иммуноглобулина, где

(а) переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит:

CDR1, содержащую SEQ ID NO: 1;

CDR2, содержащую SEQ ID NO: 2; и

CDR3, содержащую SEQ ID NO: 3;

и переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит

CDR1, содержащую SEQ ID NO: 4;

CDR2, содержащую SEQ ID NO: 5; и

CDR3, содержащую SEQ ID NO: 6;

(b) переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 24-33 и/или содержит по меньшей мере области CDR любой из SEQ ID NO: 24-33, и переменная область легкой цепи иммуноглобулина имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 34 или 35, и/или содержит по меньшей мере области CDR любой из SEQ ID NO: 34 или 35;

(с) переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит:

CDR1, содержащую SEQ ID NO: 7;

CDR2, содержащую SEQ ID NO: 8; и

CDR3, содержащую SEQ ID NO: 9;

и переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит

CDR1, содержащую SEQ ID NO: 10;

CDR2, содержащую SEQ ID NO: 11; и

CDR3, содержащую SEQ ID NO: 12;

или

(d) переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 43-47 или 61-63 и/или содержит по меньшей мере области CDR любой из SEQ ID NO: 43-47 или 61-63, и переменная область легкой цепи иммуноглобулина имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 48-50 и/или содержит по меньшей мере области CDR любой из SEQ ID NO: 48-50.

2. Анти-PD-1 связывающий агент по п.1, где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 24-33 и/или содержит по меньшей мере области CDR любой из SEQ ID NO: 24-33.

3. Анти-PD-1 связывающий агент по п.1, содержащий переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 24-33.

4. Анти-PD-1 связывающий агент по любому из п.п. 1-3, где переменная область легкой цепи иммуноглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности

последовательности с SEQ ID NO: 34 или 35 и/или содержит по меньшей мере области CDR любой из SEQ ID NO: 34 или 35.

5. Анти-PD-1 связывающий агент по любому из п.п. 1-3, содержащий переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 34 или 35.

6. Анти-PD-1 связывающий агент по п.1, где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит:

CDR1, содержащую SEQ ID NO: 1;

CDR2, содержащую SEQ ID NO: 2; и

CDR3, содержащую SEQ ID NO: 3;

и переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит:

CDR1, содержащую SEQ ID NO: 4;

CDR2, содержащую SEQ ID NO: 5; и

CDR3, содержащую SEQ ID NO: 6.

7. Анти-PD-1 связывающий агент по п.6, где CDR1 переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина содержит любую из SEQ ID NO: 13-18.

8. Анти-PD-1 связывающий агент по п.6 или 7, где CDR3 переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина содержит любую из SEQ ID NO: 19-21.

9. Анти-PD-1 связывающий агент по любому из п.п. 5-8, где CDR1 переменной области легкой цепи иммуноглобулина содержит SEQ ID NO: 22 или 23.

10. Анти-PD-1 связывающий агент по п.4, где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит:

CDR1, содержащую SEQ ID NO: 15;

CDR2, содержащую SEQ ID NO: 2; и

CDR3, содержащую SEQ ID NO: 20;

и переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит

CDR1, содержащую SEQ ID NO: 23;

CDR2, содержащую SEQ ID NO: 5; и

CDR3, содержащую SEQ ID NO: 6;

или

где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит:

CDR1, содержащую SEQ ID NO: 15;

CDR2, содержащую SEQ ID NO: 2; и

CDR3, содержащую SEQ ID NO: 21;

и переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит

CDR1, содержащую SEQ ID NO: 23;

CDR2, содержащую SEQ ID NO: 5; и

CDR3, содержащую SEQ ID NO: 6;

или

где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит:

CDR1, содержащую SEQ ID NO: 13;

CDR2, содержащую SEQ ID NO: 2; и
CDR3, содержащую SEQ ID NO: 19;
и переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит
CDR1, содержащую SEQ ID NO: 23;
CDR2, содержащую SEQ ID NO: 5; и
CDR3, содержащий SEQ ID NO: 6.

11. Анти-PD-1 связывающий агент по п.1, где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 29 или содержит по меньшей мере области CDR SEQ ID NO: 29, и переменная область легкой цепи иммуноглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 35, или содержит по меньшей мере области CDR SEQ ID NO: 35;

или где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 30 или содержит по меньшей мере области CDR SEQ ID NO: 30, и переменная область легкой цепи иммуноглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 35 или содержит по меньшей мере области CDR SEQ ID NO: 35;

или где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 24 или содержит по меньшей мере области CDR SEQ ID NO: 24, и переменная область легкой цепи иммуноглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 34 или содержит по меньшей мере области CDR SEQ ID NO: 34.

12. Анти-PD-1 связывающий агент по п.11, где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит SEQ ID NO: 29, а переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит SEQ ID NO: 35;

или где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит SEQ ID NO: 30, а переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит SEQ ID NO: 35;

или где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит SEQ ID NO: 24, а переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит SEQ ID NO: 34.

13. Анти-PD-1 связывающий агент по п.1, где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 43-47 или 61-63 или содержит по меньшей мере области CDR любой из SEQ ID NO: 43-47 или 61-63.

14. Анти-PD-1 связывающий агент по п.1 или 13, где переменная область легкой цепи иммуноглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 48-50 или содержит по меньшей мере области CDR любой из SEQ ID NO: 48-50.

15. Анти-PD-1 связывающий агент по п.13 или 14, где тяжелая цепь иммуноглобулина содержит любую из SEQ ID NO: 43-47 или 61-63.

16. Анти-PD-1 связывающий агент по любому из п.п. 13-15, содержащий

вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 48-50.

17. Анти-PD-1 связывающий агент по п.1, где вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит:

CDR1, содержащую SEQ ID NO: 7;

CDR2, содержащую SEQ ID NO: 8; и

CDR3, содержащую SEQ ID NO: 9;

и вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина содержит

CDR1, содержащую SEQ ID NO: 10;

CDR2, содержащую SEQ ID NO: 11; и

CDR3, содержащий SEQ ID NO: 12.

18. Анти-PD-1 связывающий агент по п.17, где CDR1 вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина содержит любую из SEQ ID NO: 57-60.

19. Анти-PD-1 связывающий агент по п.17 или 18, где CDR2 вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина содержит любую из SEQ ID NO: 38-42.

20. Анти-PD-1 связывающий агент по п. 17, где вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит:

CDR1, содержащую SEQ ID NO: 57;

CDR2, содержащую SEQ ID NO: 42; и

CDR3, содержащую SEQ ID NO: 9;

и вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина содержит

CDR1, содержащую SEQ ID NO: 10;

CDR2, содержащую SEQ ID NO: 11; и

CDR3, содержащую SEQ ID NO: 12;

или

где вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит:

CDR1, содержащую SEQ ID NO: 57;

CDR2, содержащую SEQ ID NO: 41; и

CDR3, содержащую SEQ ID NO: 9;

и вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина содержит

CDR1, содержащую SEQ ID NO: 10;

CDR2, содержащую SEQ ID NO: 11; и

CDR3, содержащую SEQ ID NO: 12.

21. Анти-PD-1 связывающий агент по п.1, где вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 47 или содержит по меньшей мере области CDR SEQ ID NO: 47;

и вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 49, или содержит по меньшей мере области CDR SEQ ID NO: 49;

или где вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 46, или содержит по меньшей

мере области CDR SEQ ID NO: 46;

и переменная область легкой цепи иммуноглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 50, или содержит по меньшей мере области CDR SEQ ID NO: 50.

22. Анти-PD-1 связывающий агент по п.21, содержащий переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 47 и переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 49;

или содержащий переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 46 и переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 50.

23. Анти-PD-1 связывающий агент, по любому из п.п. 1-22, где анти-PD-1 связывающий агент представляет собой антитело, конъюгат антитела или его антигенсвязывающий фрагмент.

24. Анти-PD-1 связывающий агент по любому из п.п. 1-23, где анти-PD-1 связывающий агент, представляет собой F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, scFv, dsFv или одноцепочечный связывающий полипептид.

25. Анти-PD-1 связывающий агент по любому из п.п. 1-24, где анти-PD-1 связывающий агент содержит Fc-область IgG, которая связывает Fc-рецептор на антигенпрезентирующей клетке.

26. Анти-PD-1 связывающий агент по любому из п.п. 1-25, где анти-PD-1 связывающий агент содержит Fc-область IgG1 или другую Fc-область, которая связывает FcγR.

27. Анти-PD-1 связывающий агент по п.1, содержащий тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую SEQ ID NO: 36, и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую SEQ ID NO: 37.

28. Анти-PD-1 связывающий агент по п.1, содержащий тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую SEQ ID NO: 51, и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую SEQ ID NO: 52.

29. Фармацевтическая композиция, содержащая (а) анти-PD-1 связывающий агент по любому из п.п. 1-28, и (b) фармацевтически приемлемый носитель.

30. Способ ингибирования иммунного ответа у млекопитающего, который включает введение млекопитающему анти-PD-1 связывающего агента по любому из п.п. 1-28 или фармацевтической композиции по п.29.

31. Способ лечения воспалительного или аутоиммунного нарушения у млекопитающего, который включает введение анти-PD-1 связывающего агента по любому из п.п. 1-28 или фармацевтической композиции по п.29 млекопитающему с воспалительным или аутоиммунным нарушением, в результате чего происходит лечение этого нарушения.

32. Способ по п.31, где воспалительное или аутоиммунное нарушение представляет собой первичный билиарный холангит (ПБХ), реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ), витилиго, АНЦА-ассоциированный васкулит, диабет 1 типа или

неинфекционный увеит.

33. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь иммуноглобулина и/или легкую цепь иммуноглобулина анти-PD-1 связывающего агента по любому из п.п. 1-28, необязательно в векторе.

34. Клетка, которая экспрессирует анти-PD-1 связывающий агент по любому из п.п. 1-28.

35. Способ получения анти-PD-1 связывающего агента по любому из п.п. 1-28, включающий экспрессию в клетке нуклеотидной последовательности, кодирующей тяжелую цепь иммуноглобулина, и нуклеотидной последовательности, кодирующей легкую цепь иммуноглобулина анти-PD-1 связывающего агента по любому из п.п. 1-28.

36. Анти-PD-1 связывающий агент по любому из п.п. 1-28 или фармацевтическая композиция по п.29 для ингибирования иммунного ответа у млекопитающего.

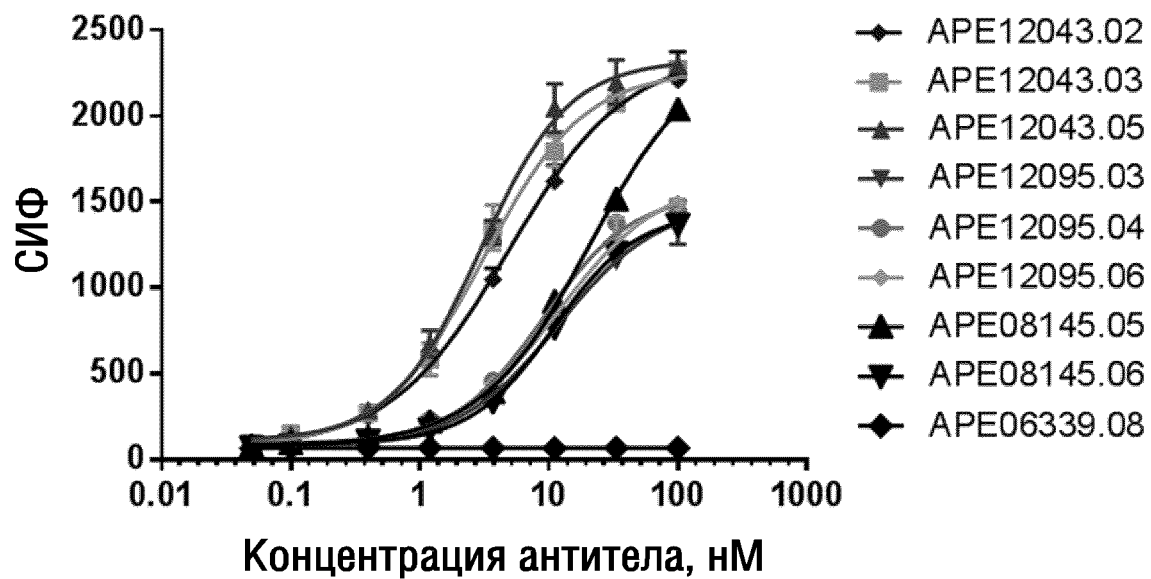
37. Анти-PD-1 связывающий агент по любому из п.п. 1-28 или фармацевтическая композиция по п.29 для лечения воспалительного или аутоиммунного нарушения у млекопитающего.

38. Анти-PD-1 связывающий агент или фармацевтическая композиция по п. 37, где воспалительное или аутоиммунное нарушение представляет собой первичный билиарный холангит (ПБХ), реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ), витилиго, АНЦА-ассоциированный васкулит, диабет 1 типа или неинфекционный увеит.

По доверенности

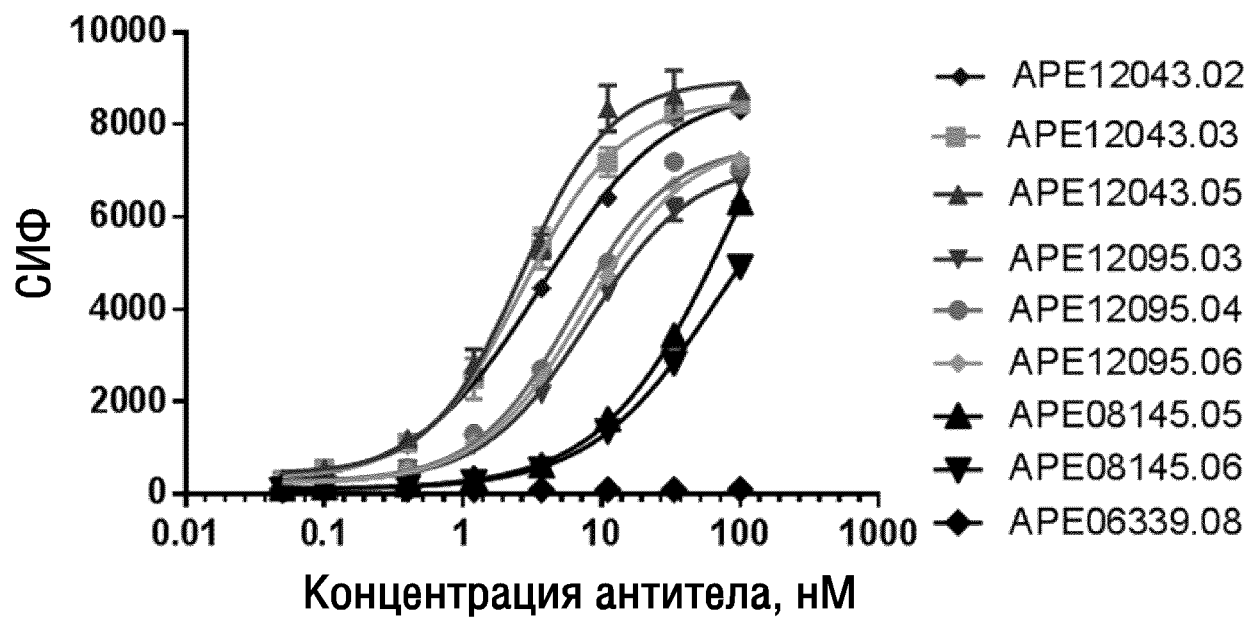
ФИГ.1

Клетки HEK 293,
трансфицированные PD-1 человека

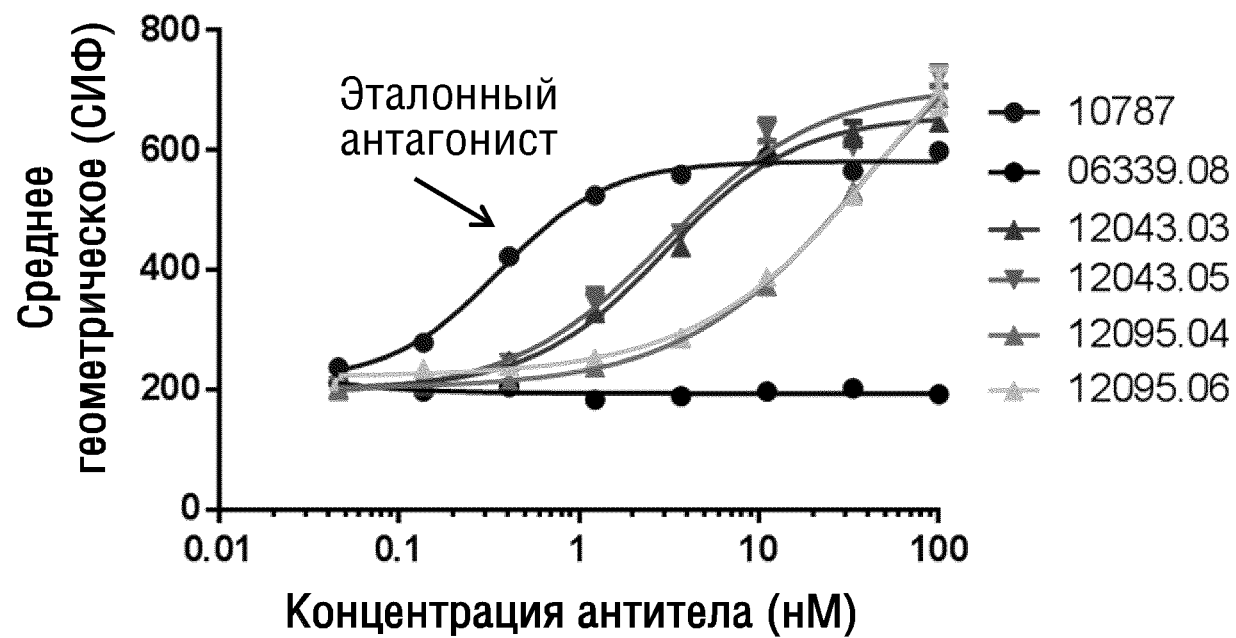


ФИГ.2

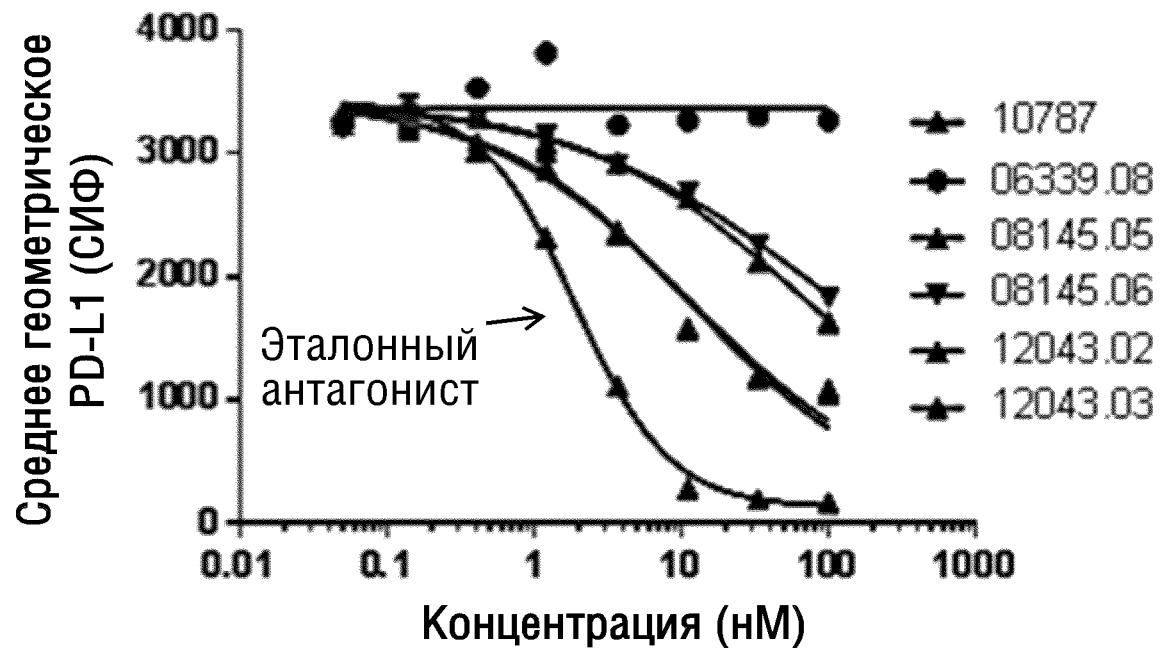
Клетки HEK 293,
трансфицированные PD-1 яванского макака



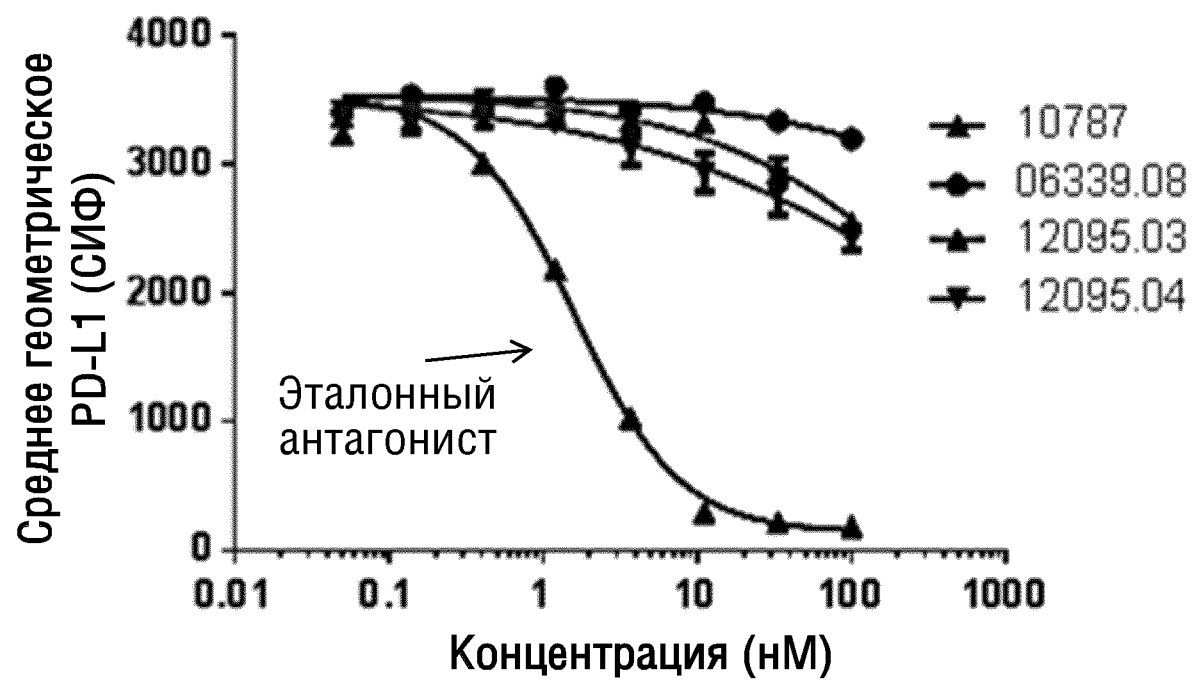
ФИГ.3



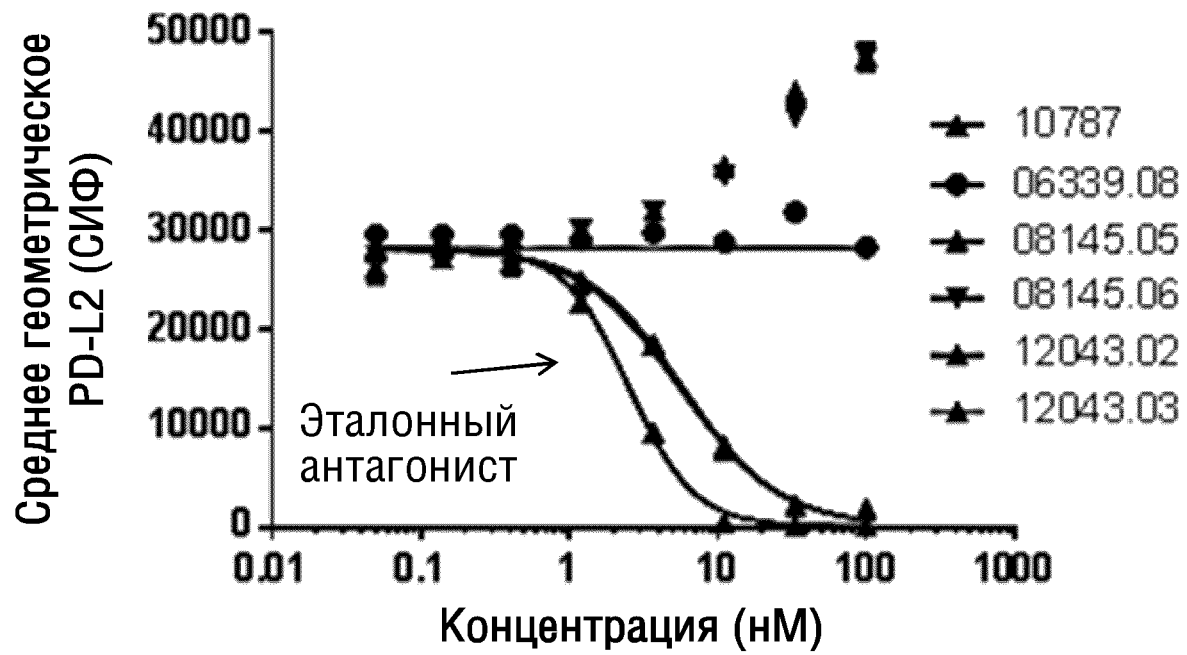
ФИГ.4



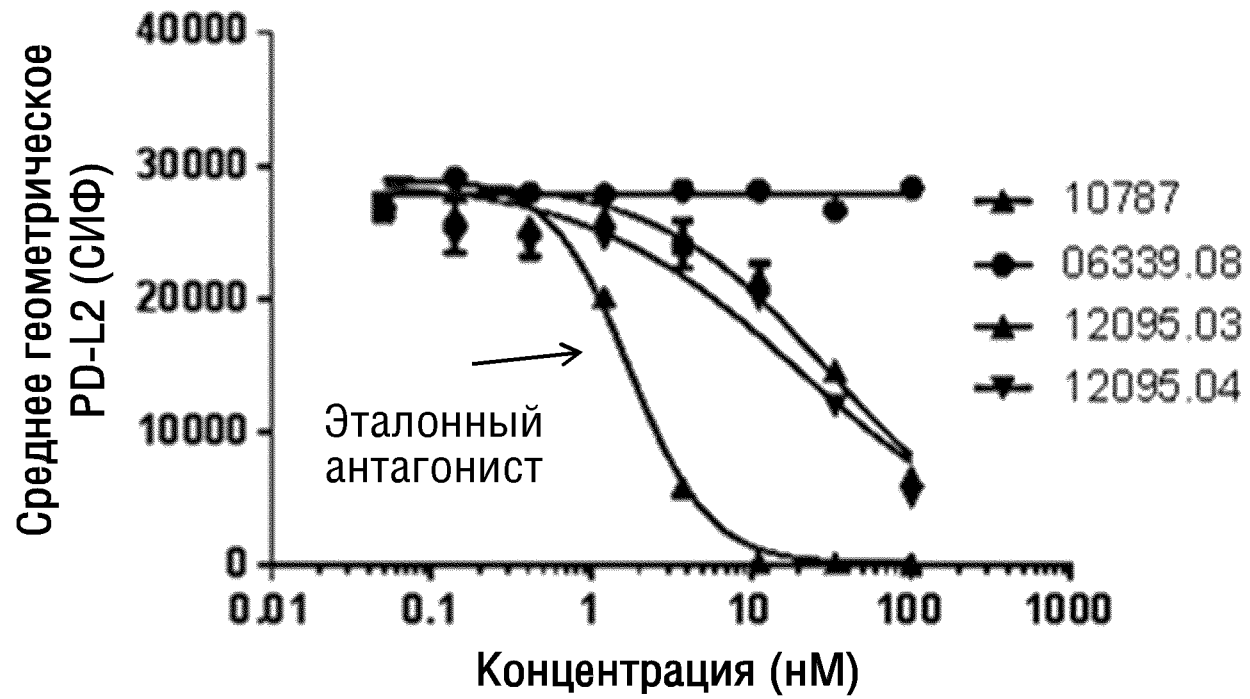
ФИГ.5



ФИГ.6



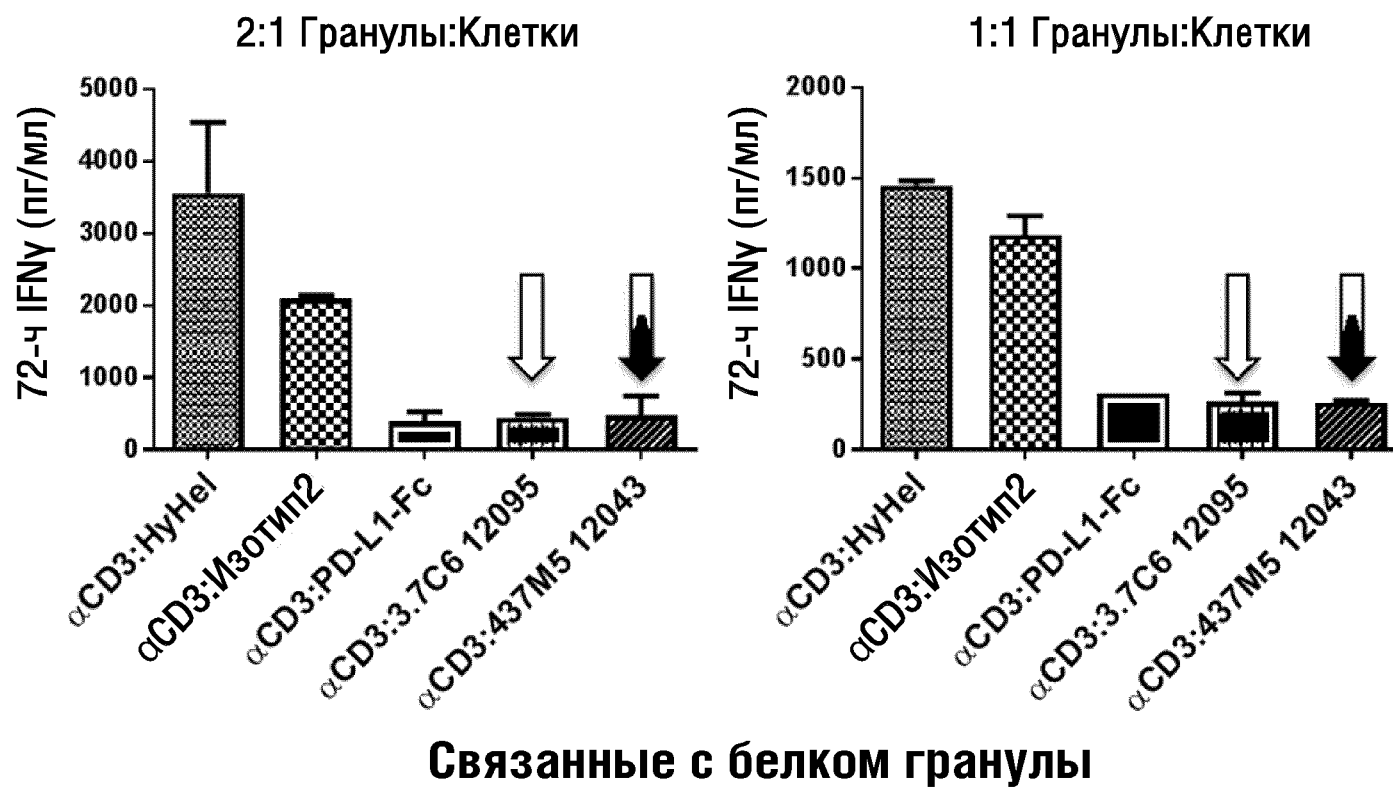
ФИГ.7



ФИГ.8А

ФИГ.8В

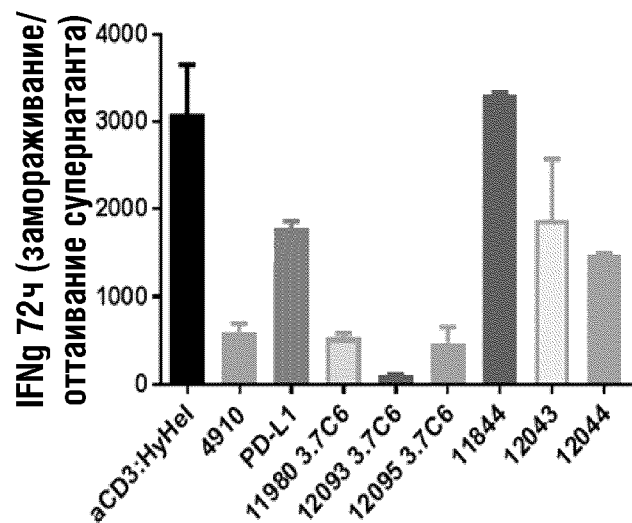
Донор 1117 + 250 нг/мл анти-CD28



ФИГ.9А

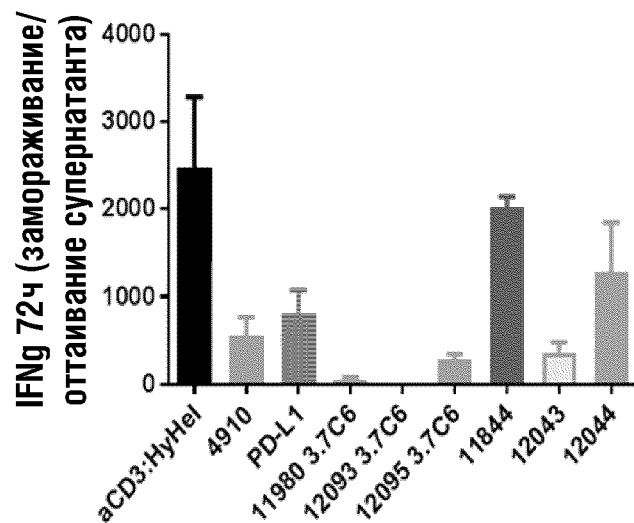
Донор 1118

50 нг/мл анти-CD28, 4:1
[гранулы: клетки]



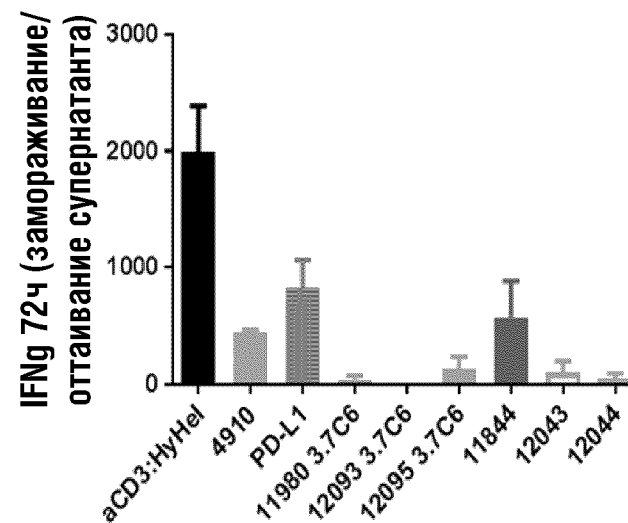
ФИГ.9В

50 нг/мл анти-CD28, 2:1
[гранулы: клетки]

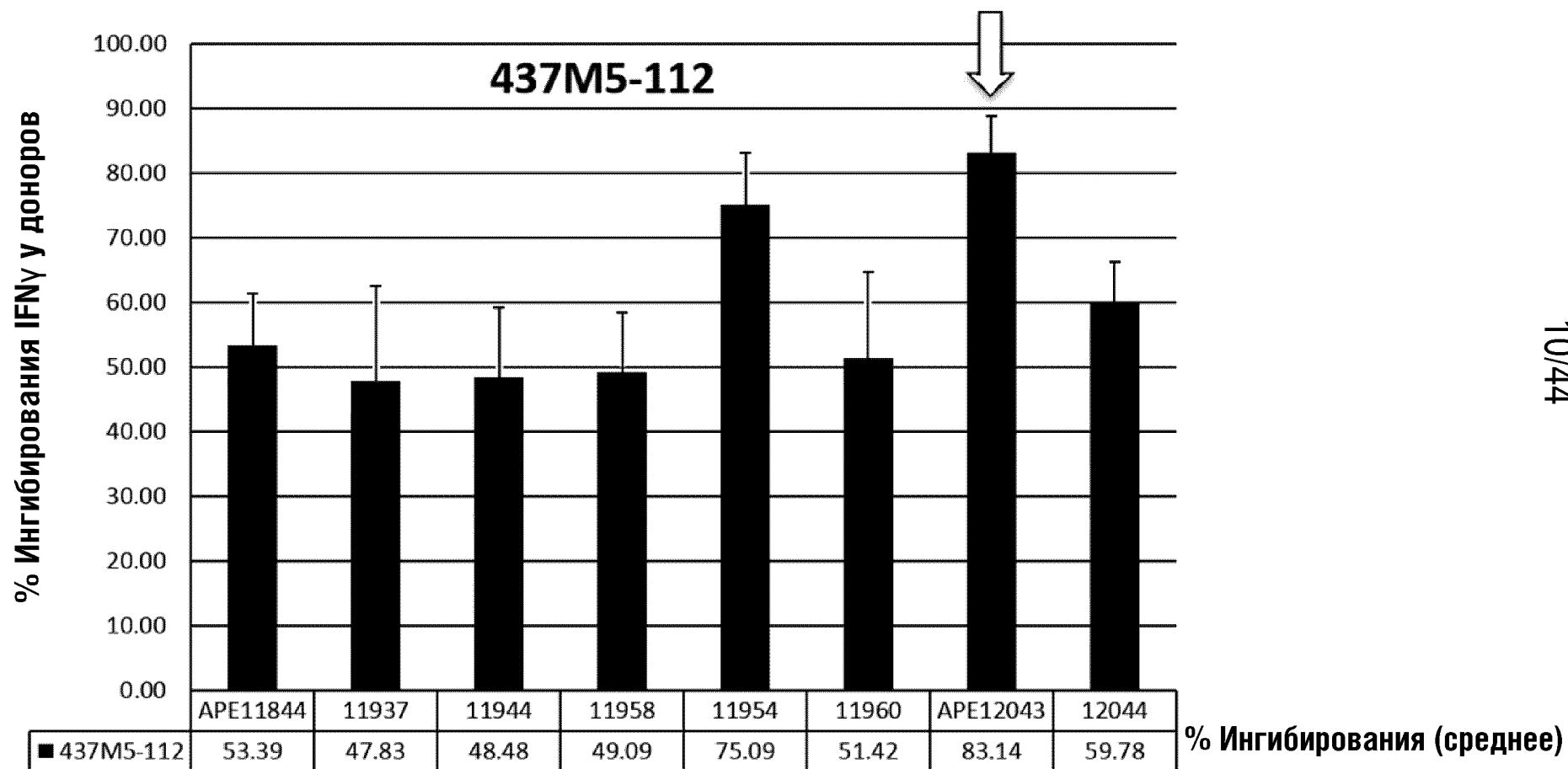


ФИГ.9С

50 нг/мл анти-CD28, 1:1
[гранулы: клетки]



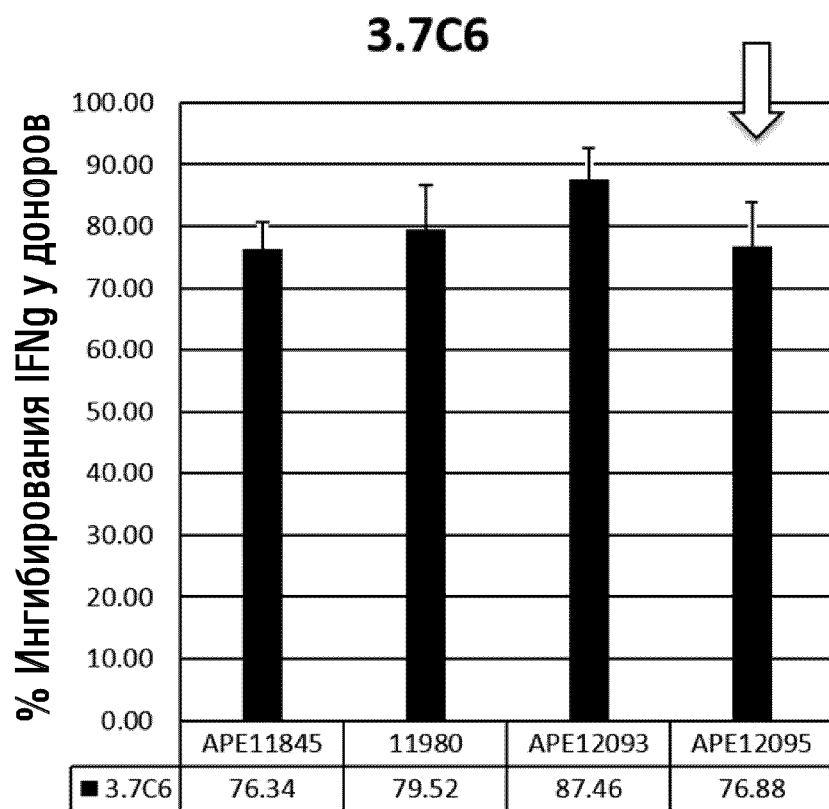
ФИГ.10А



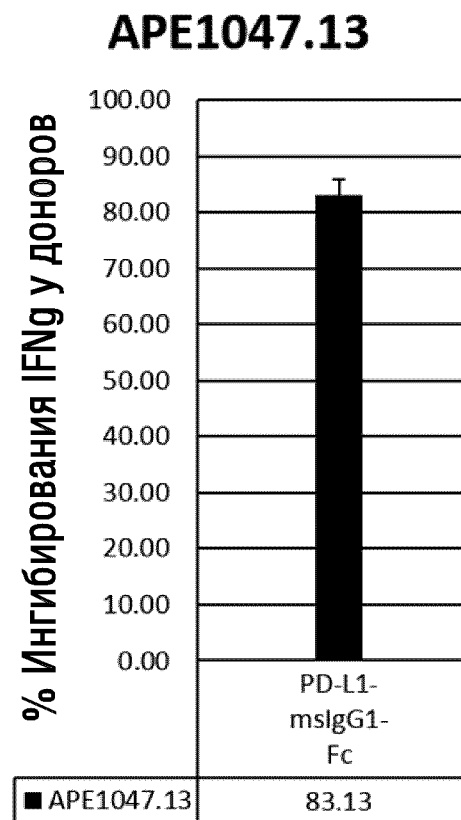
ФИГ.10В

437M5-112	Описание	% Ингибирования IFN γ		11/44
АРЕ11844	с привитыми CDR 437M5-112 R71A,T73K,I75S/исходное	Среднее \pm СКО	Доноры (N)	
АРЕ11844	с привитыми CDR 437M5-112 R71A,T73K,I75S/исходное	53.39 \pm 7.92	8	11/44
АРЕ11937	437M5-112 N31S,T33S,R71A,T73K,I75S,G99R/исходное	47.83 \pm 14.72	3	
АРЕ11944	437M5-112 N31S,T33S,R71A,T73K,I75S,G99R,V100сА/исходное	48.48 \pm 10.61	3	
АРЕ11954	437M5-112 N31S,R71A,T73K,I75S,G99R/исходное	75.09 \pm 7.91	3	
АРЕ11958	437M5-112 N31D,Y32H,R71A,T73K,I75S,G99R/исходное	49.09 \pm 9.38	4	
АРЕ11960	437M5-112 N31D,Y32H,M34L,R71A,T73K,I75S,G99R,V100сА/исходное	51.42 \pm 13.29	3	
АРЕ12043	437M5-112; N31S,T33S,R71A,T73K,I75S,G99R/Y32F	83.14 \pm 5.72	7	

ФИГ.11А



ФИГ.11В

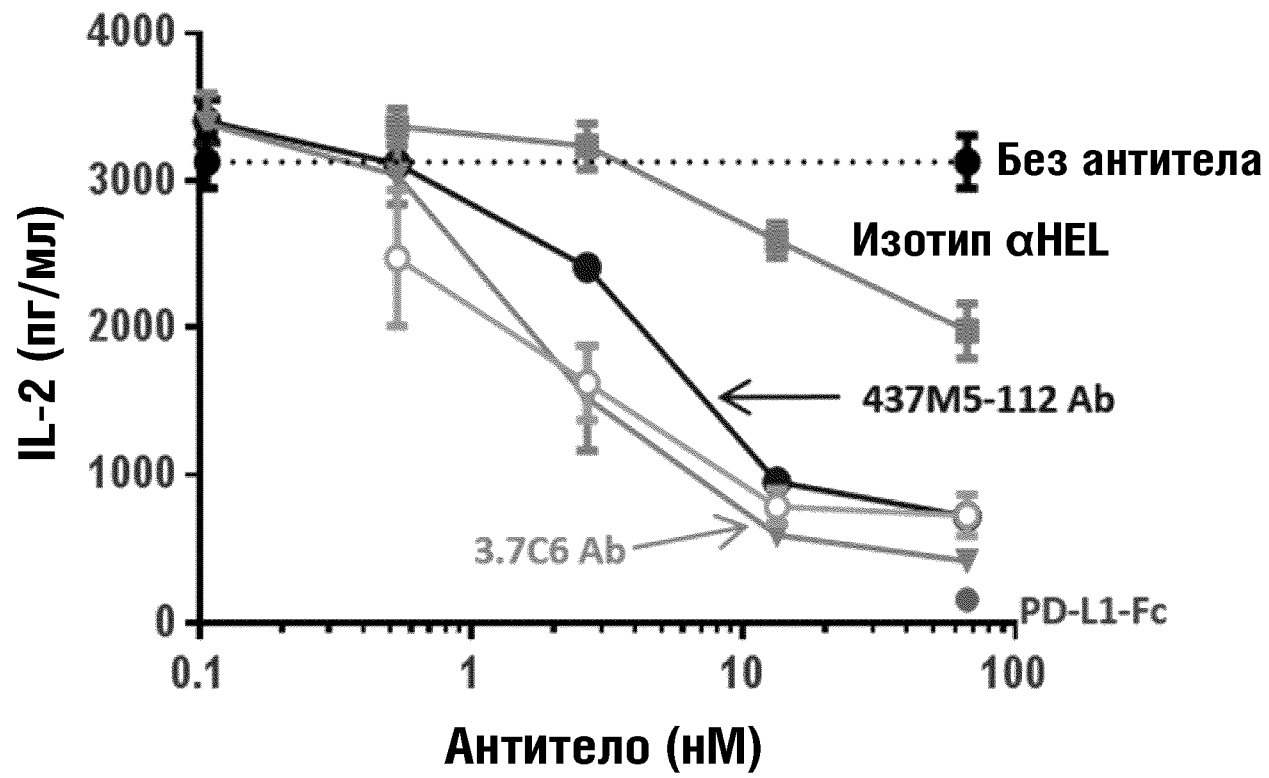


ФИГ.11С

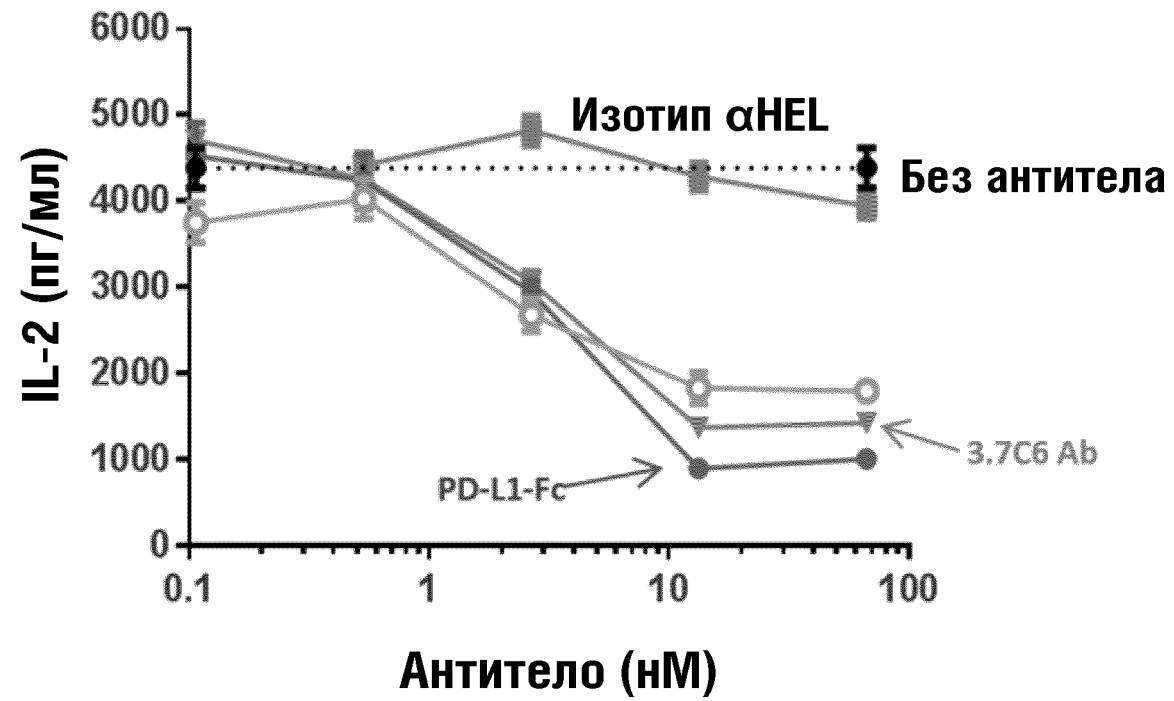
3.7C6	Описание	% Ингибирования IFN γ	
		Среднее \pm СКО	Доноры (N)
APE11845	с привитыми CDR 3.7C6 V68A/исходное	± 4.34	4
APE11980	3.7C6 V68A/G100Q,K103R,V104L	79.52 ± 7.09	4
APE12093	3.7C6 A52aV,D62Q,V68A/G100Q,K103R,V104L	87.46 ± 5.16	4
APE12095	3.7C6 A52aI,D62Q,V68Q/parental	76.88 ± 7.00	6
APE1047.13	PD-L1-msIgG1-Fc	83.13 ± 2.79	10

13/44

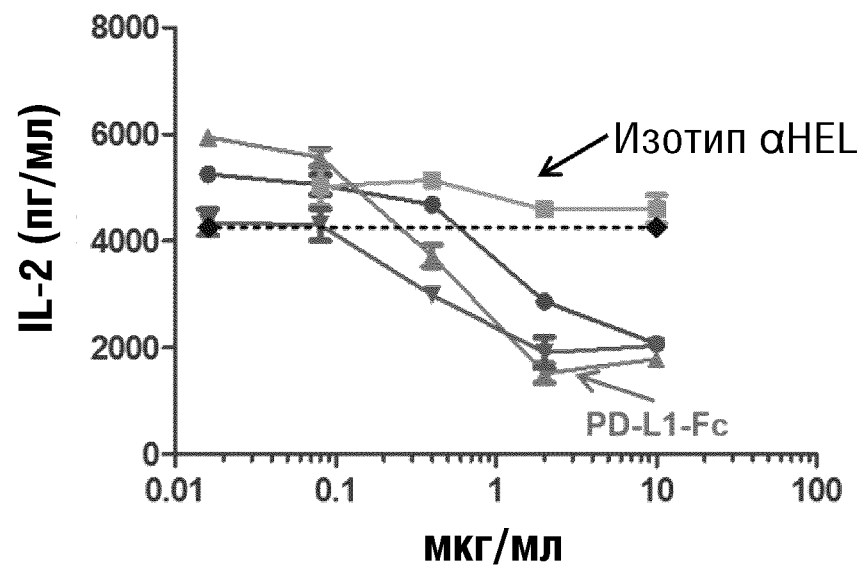
ФИГ.12А



ФИГ.12В

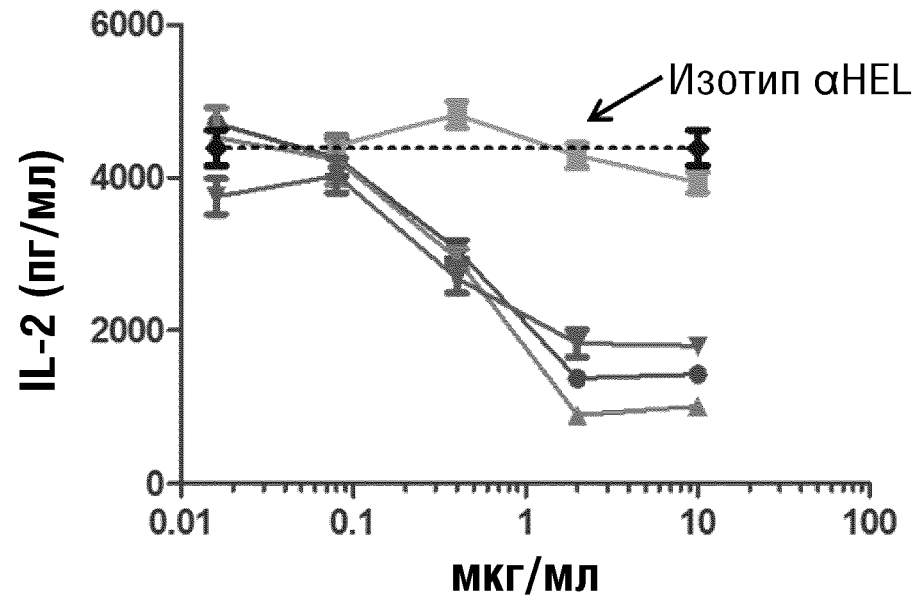


ФИГ.13А



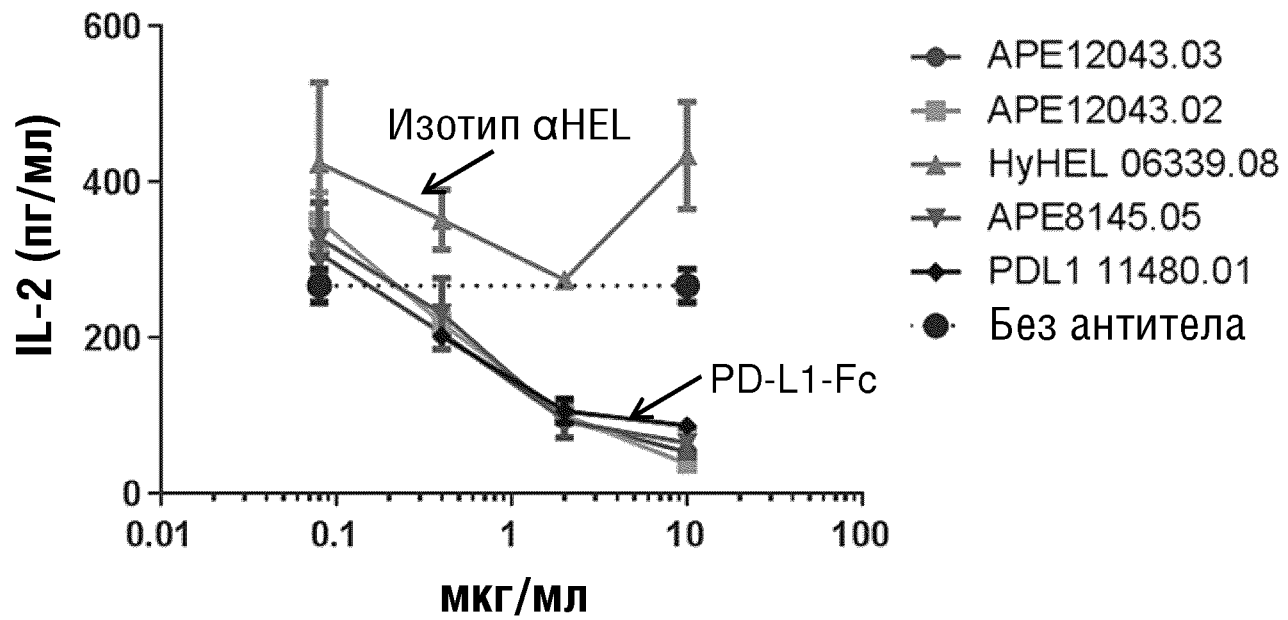
- APE12043.03
- HuHEL 06339.07
- ▲ PDL1 11480
- ▼ APE8145
- ◆ Без антитела

ФИГ.13В

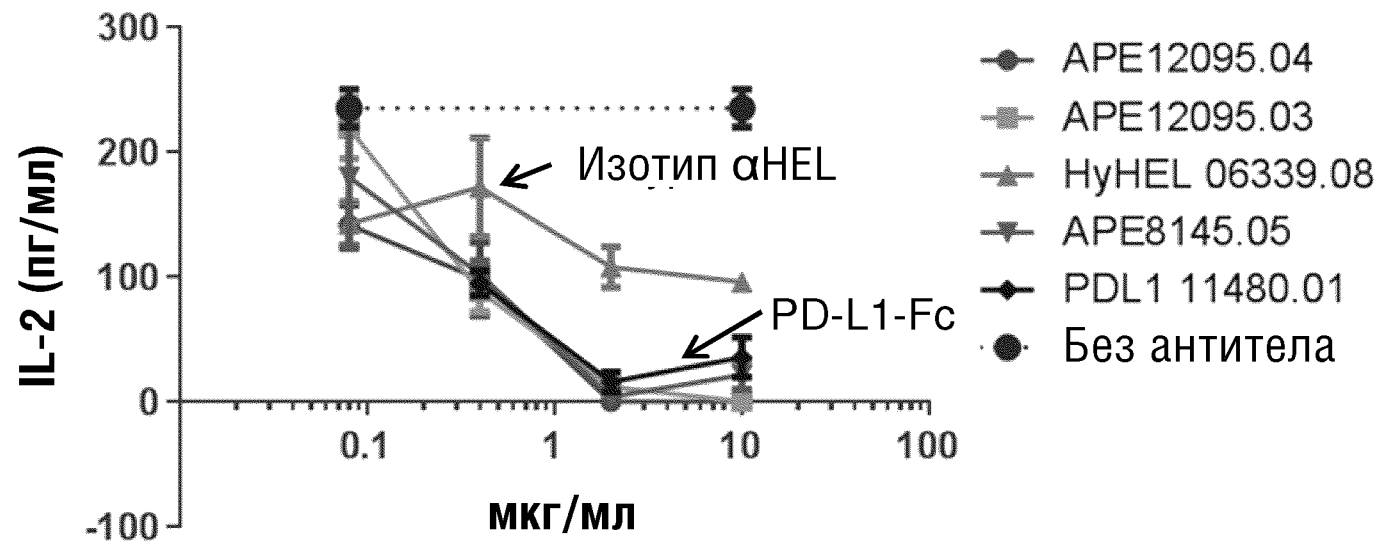


- APE12095.03
- HyHEL 06339.07
- ▲ PDL1 11480
- ▼ APE8145.05
- ◆ Без антитела

ФИГ.14А

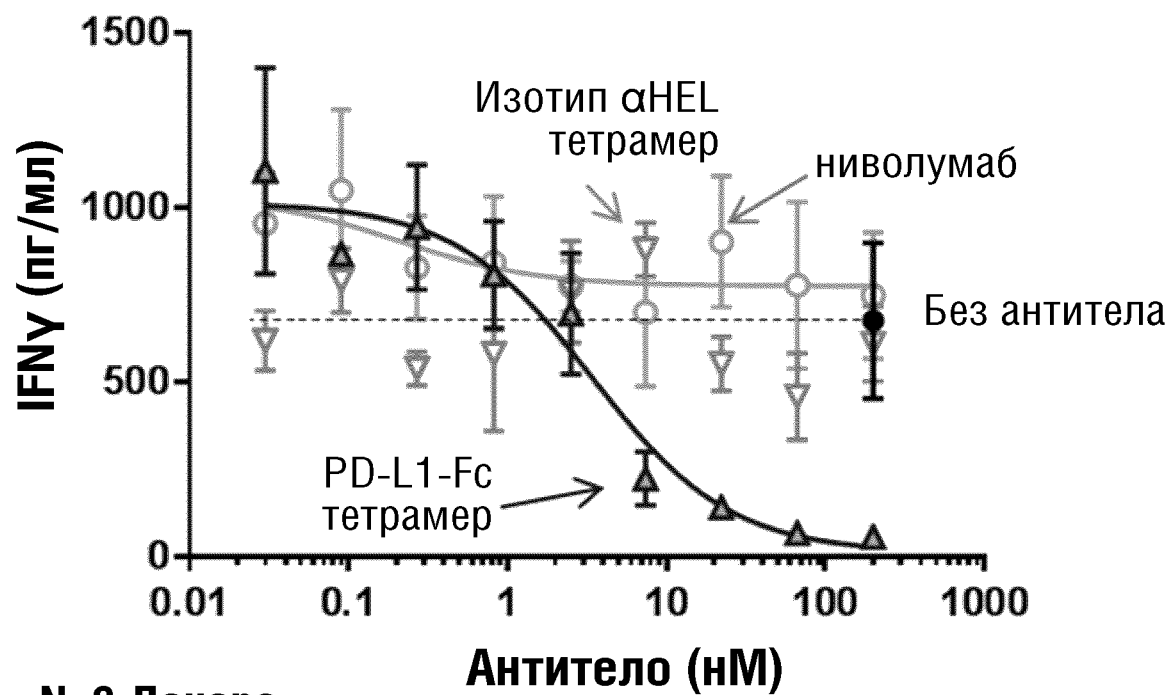


ФИГ.14В



ФИГ.15А

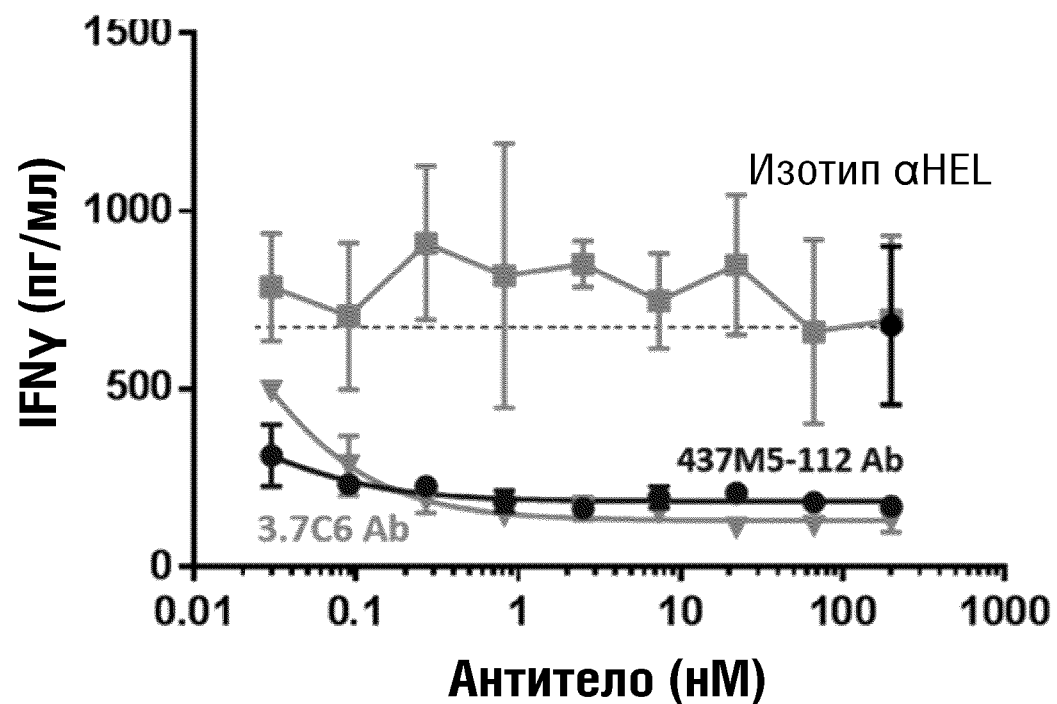
Контроли: 5 мкг/мл столбнячного анатоксина (ТТ)
Анти-PD-L1/PD-L2 антитела



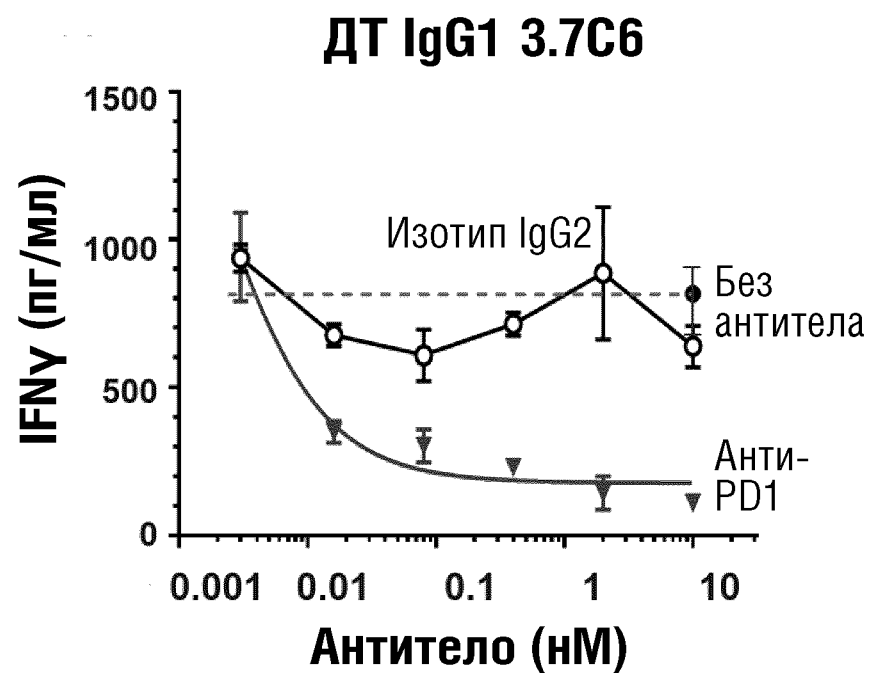
20/44

ФИГ.15В

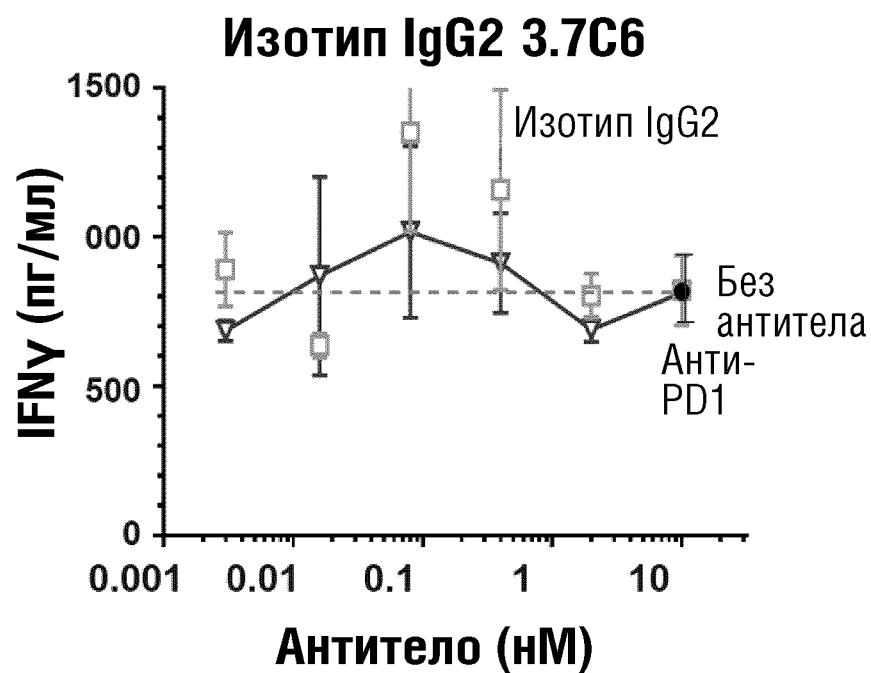
**PD-1 агонистические антитела:
5 мкг/мл столбнячного анатоксина (ТТ)
Анти-PD-L1/PD-L2 антитела**



ФИГ.15С

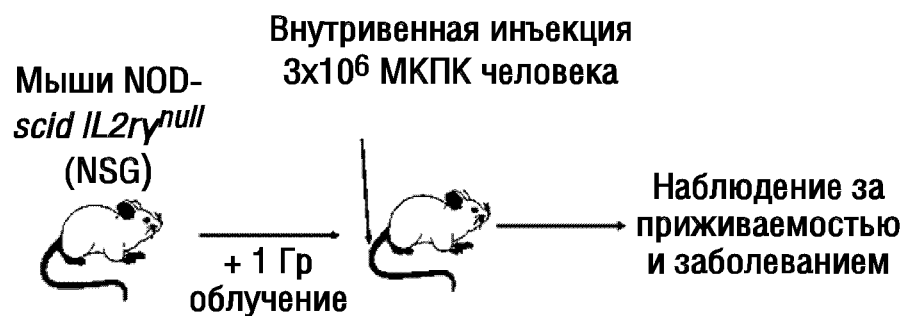


ФИГ.15D



ФИГ.16А

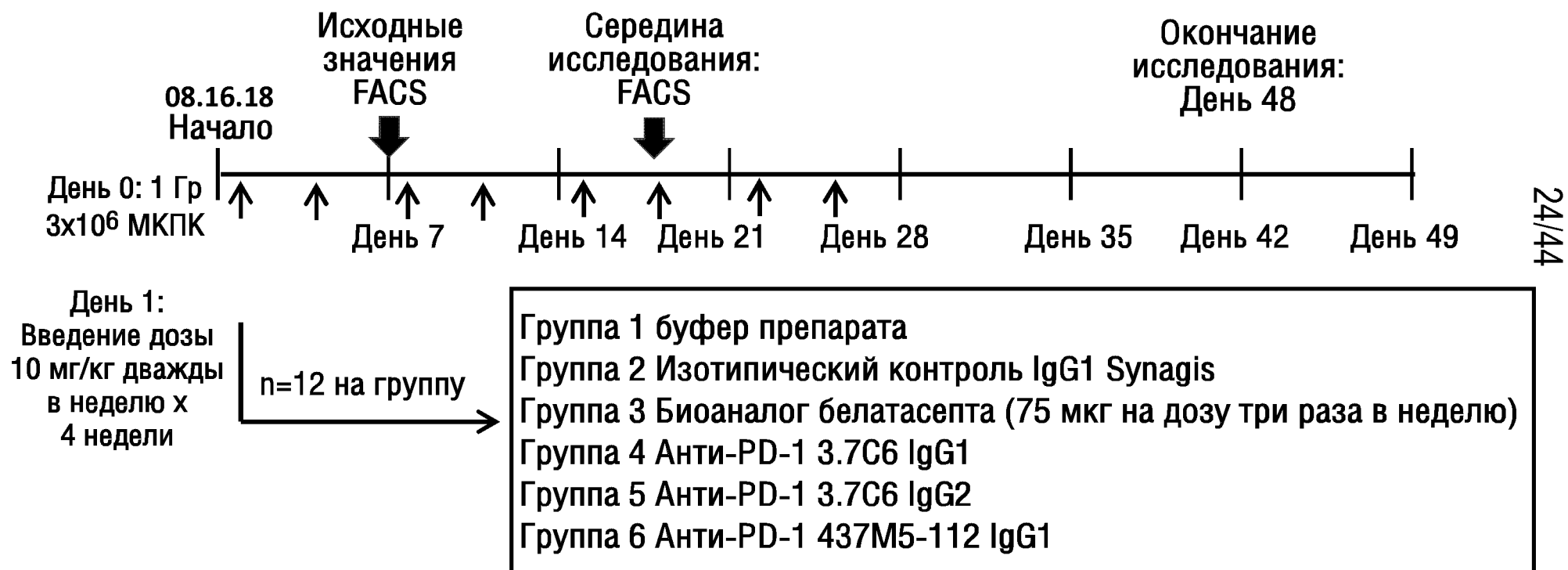
**Модель реакции
«трансплантат
против хозяина»**



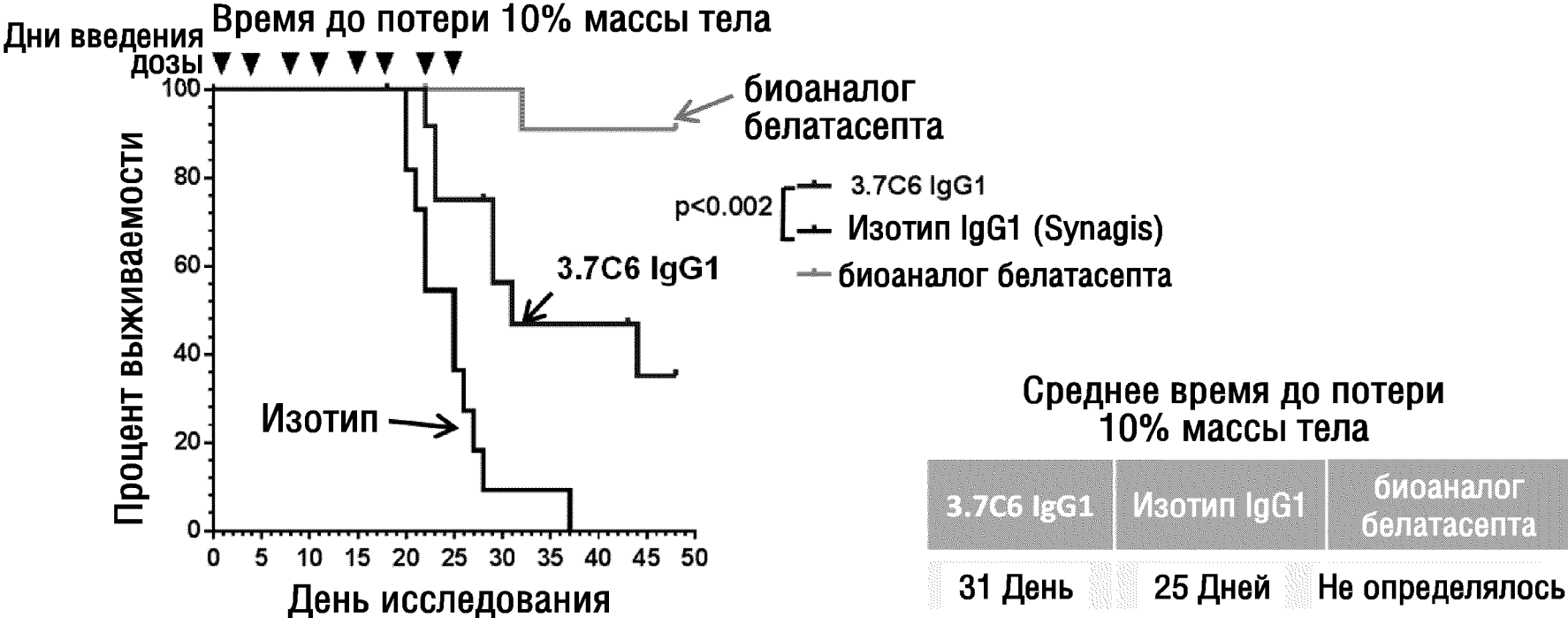
Конечные критерии оценки:

- Потеря веса
- Смерть
- Баллы РТПХ: потеря веса, активность, текстура меха, бледность, положение тела

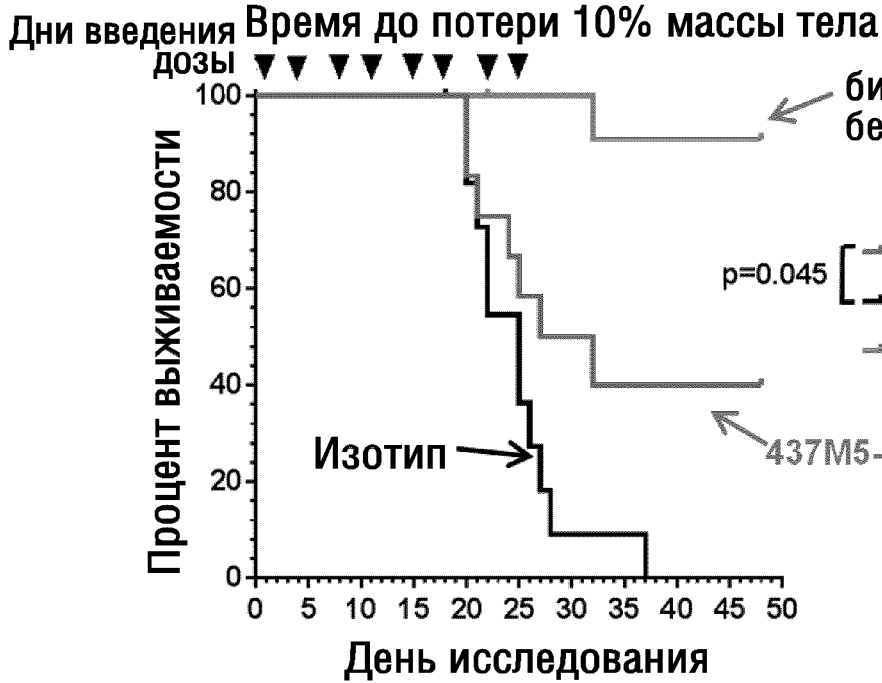
ФИГ.16В



ФИГ.16С



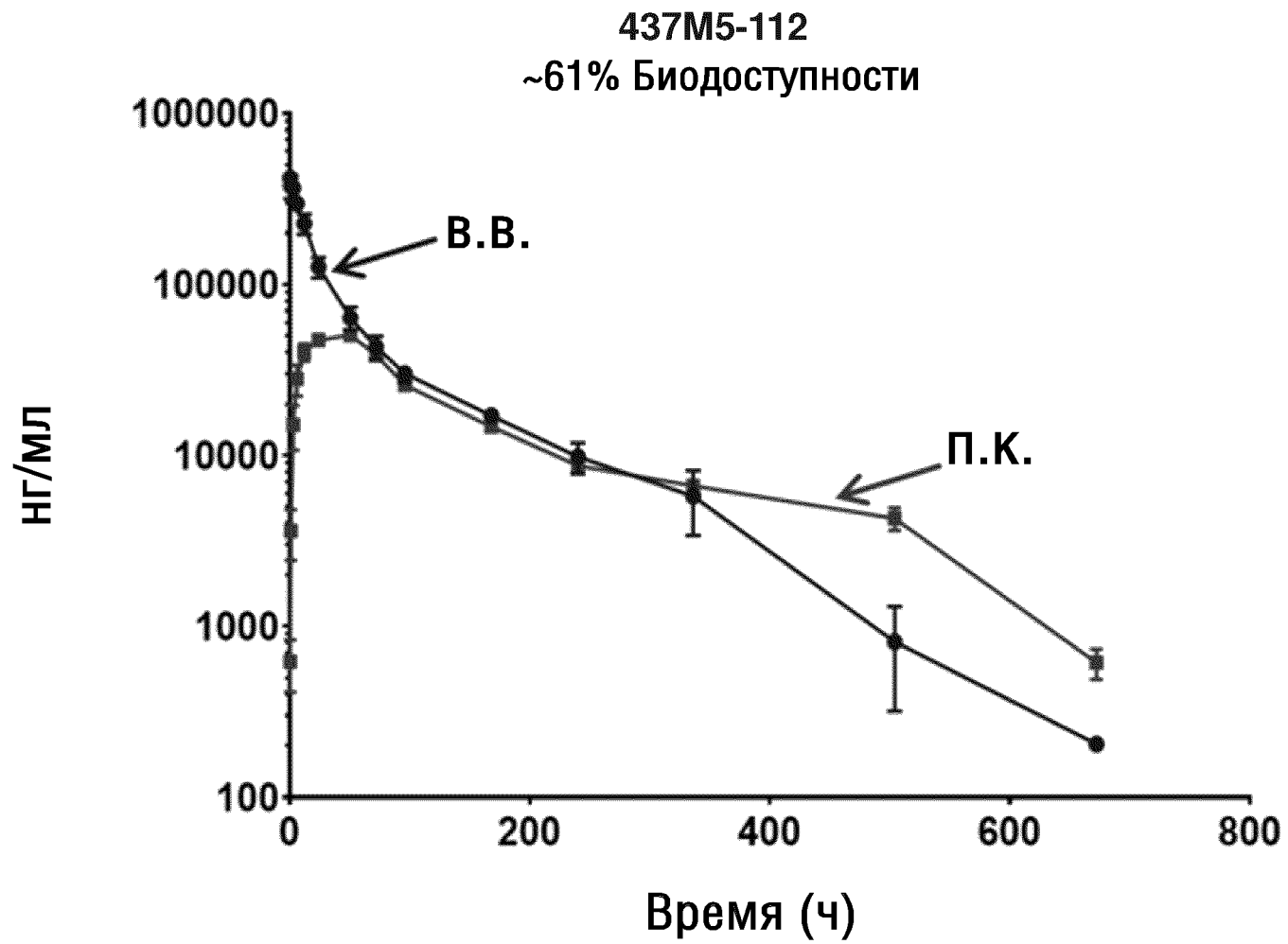
ФИГ.16D



Среднее время до потери 10% массы тела

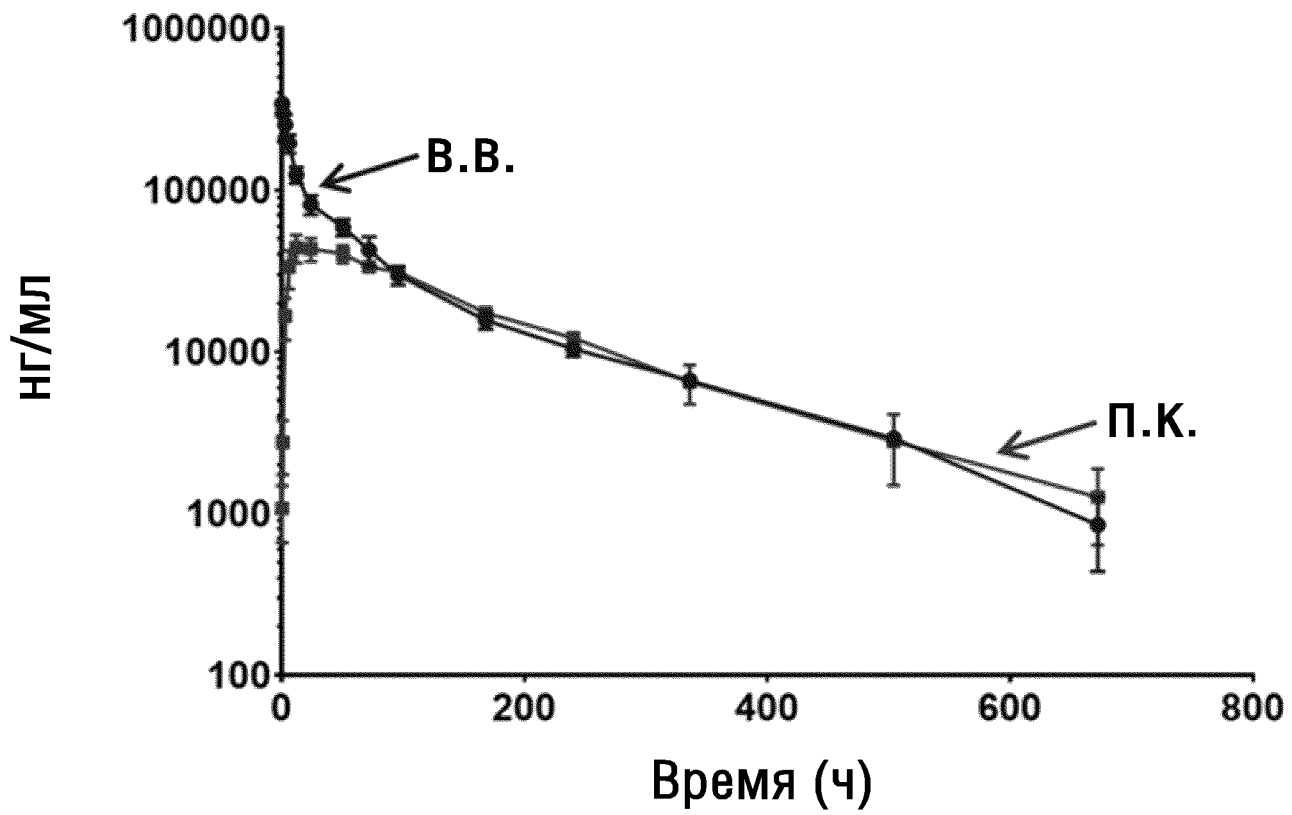
437M5-112 IgG1	Изотип IgG1	биоаналог белатасепта
29.5 День	25 Дней	Не определялось

ФИГ.17А



ФИГ.17В

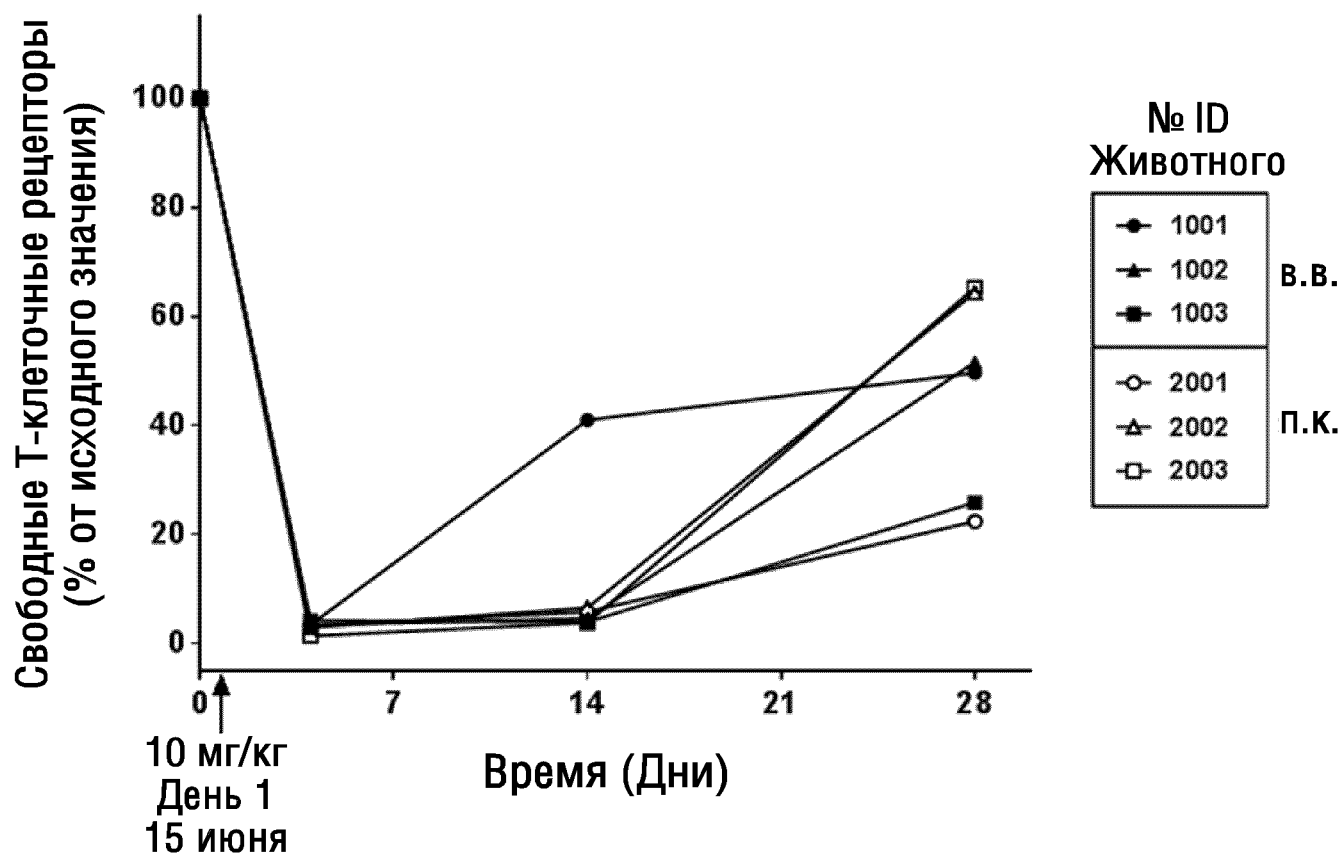
3.7С6
~70% Биодоступности



28/44

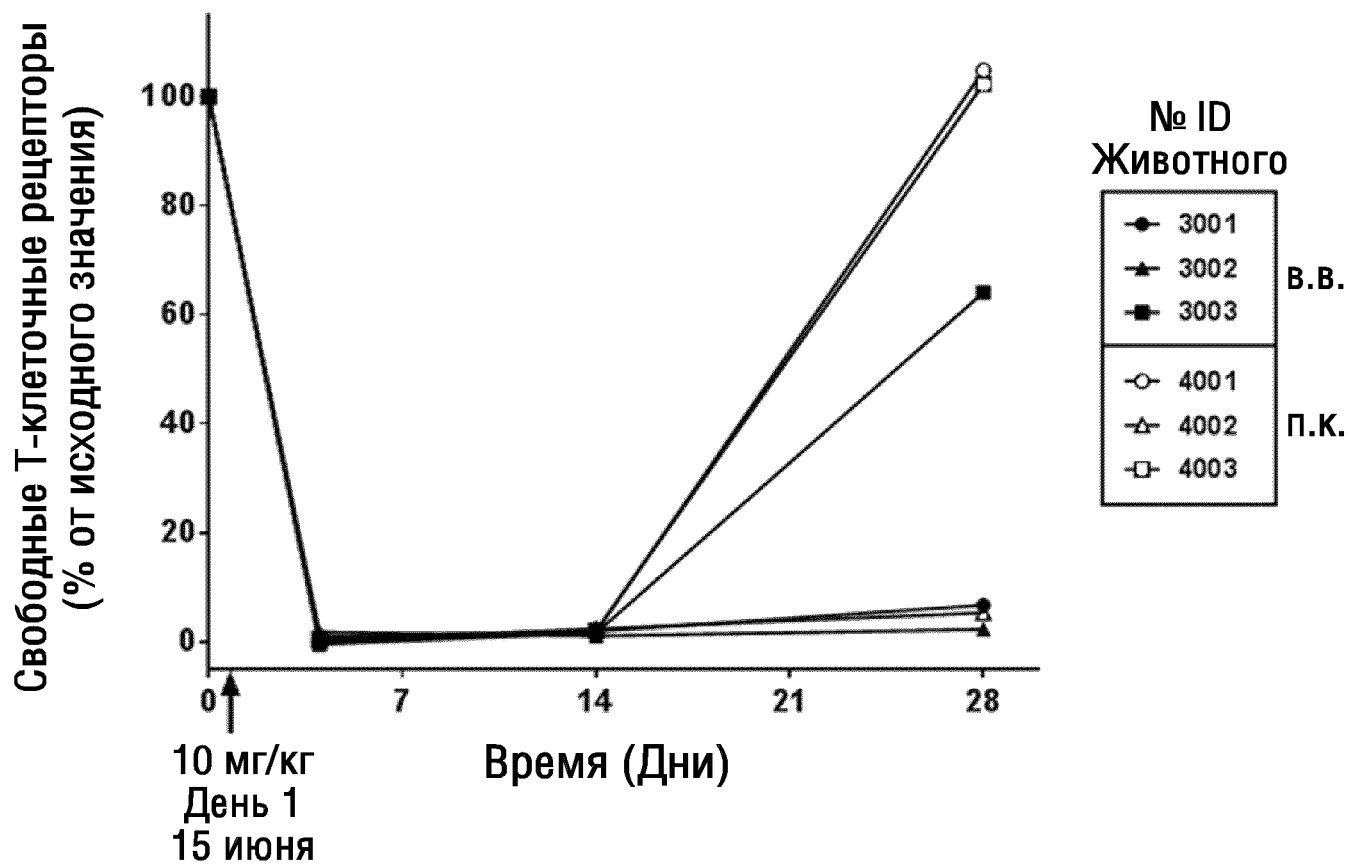
ФИГ.18А

Занятость PD-рецептора при введении
однократной дозы 437M5-112



ФИГ.18В

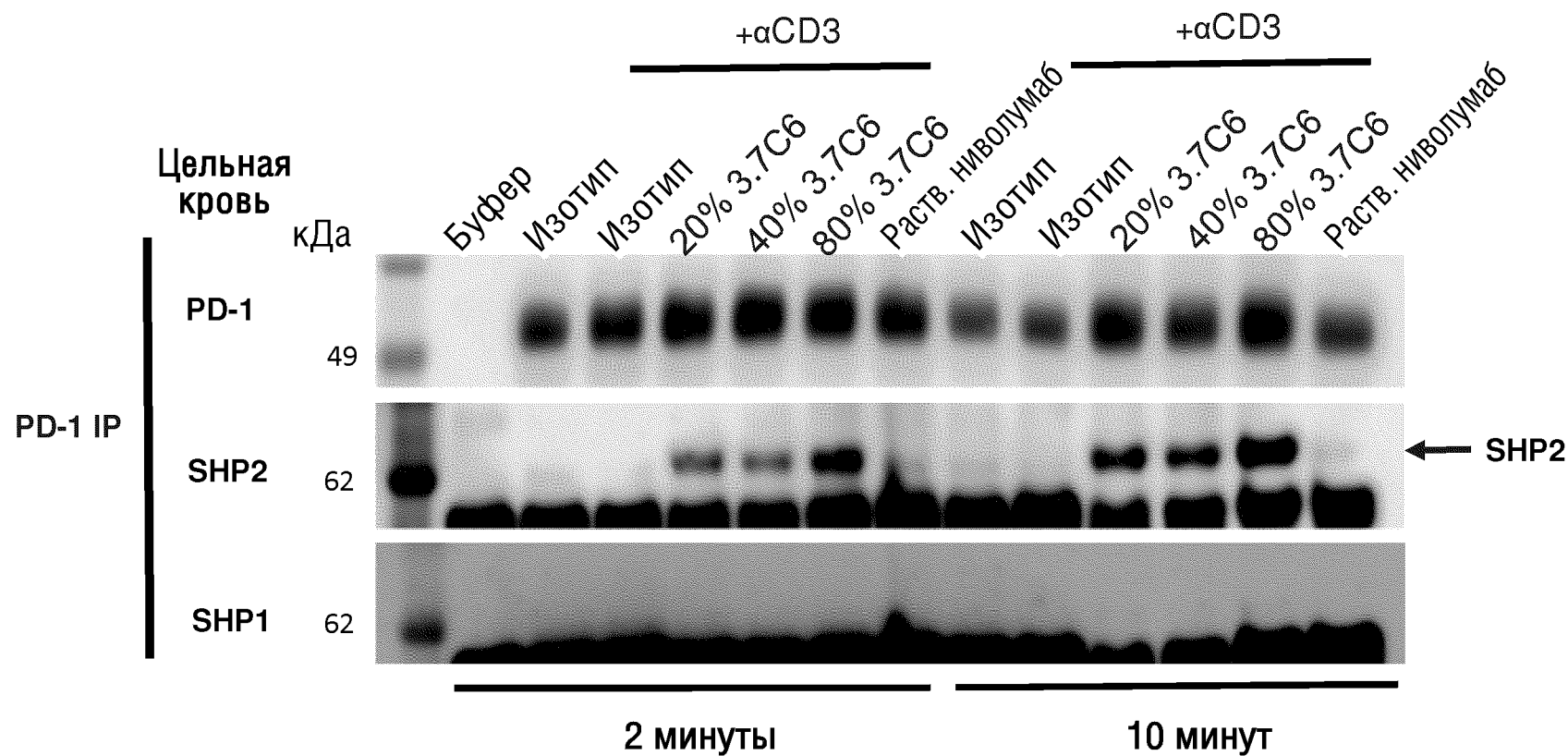
Занятость PD-рецептора при введении
однократной дозы 3.7С6



30/44

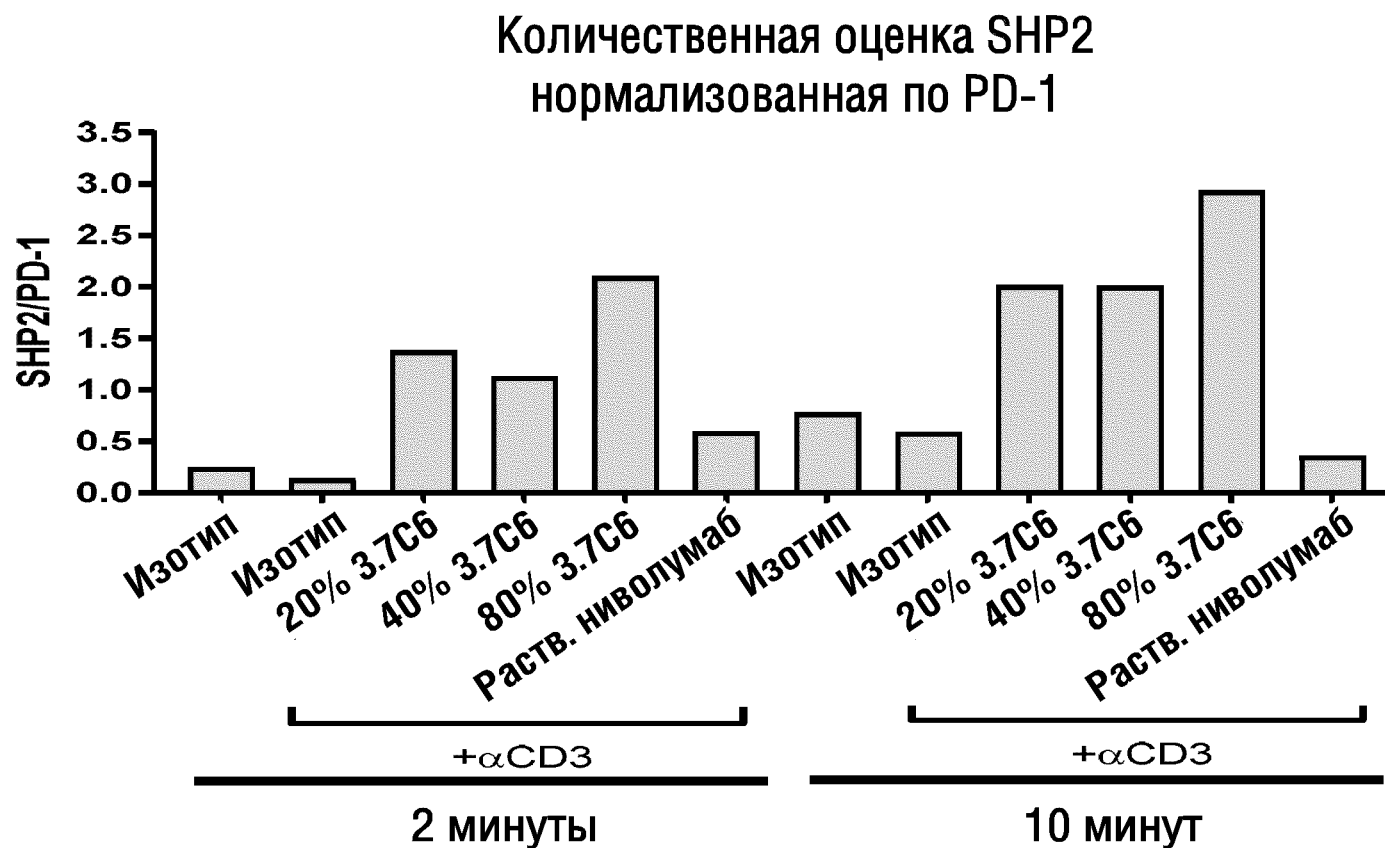
ФИГ.19А

Антитело 3.7С6 индуцирует рекрутирование SHP2, но не SHP1, на PD-1 после активации клеток Jurkat PD-1



ФИГ.19В

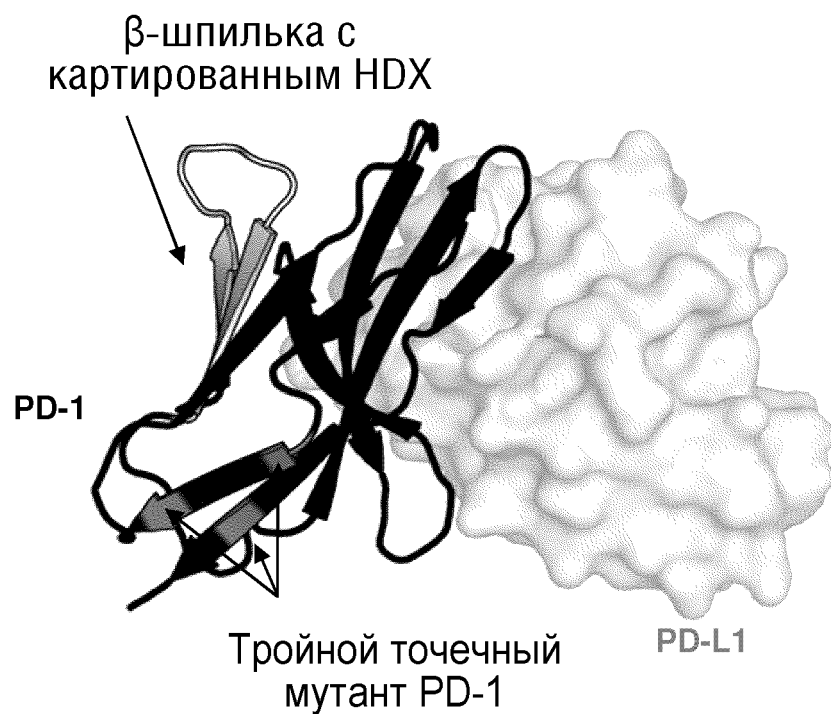
Антитело 3.7С6 индуцирует рекрутирование SHP2, но не SHP1, на PD-1 после активации клеток Jurkat PD-1



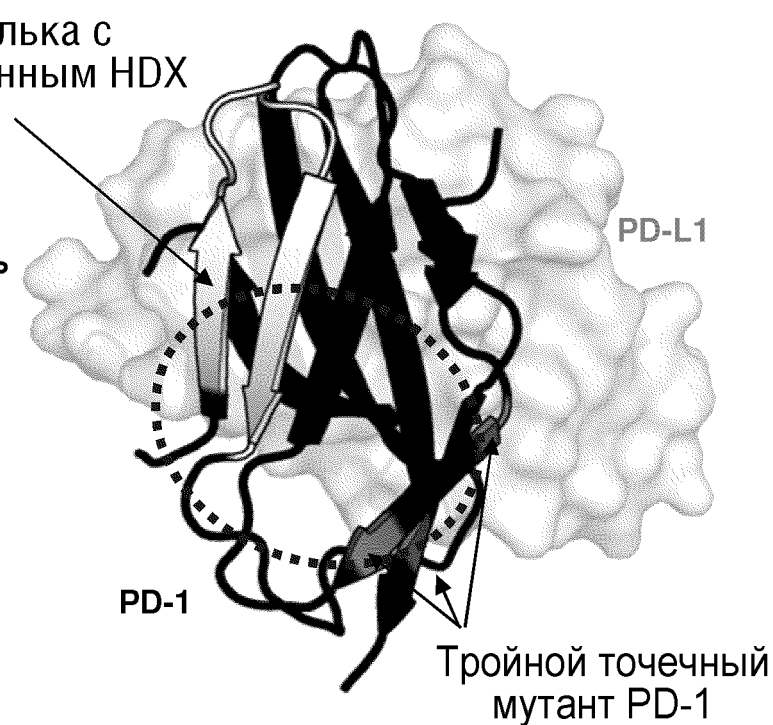
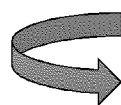
ФИГ.20А

ФИГ.20В

Картирование эпитопа PD-1, связанного с антителом 3.7С6, с помощью водородно-дейтериевого обмена и мутационного анализа PD-1

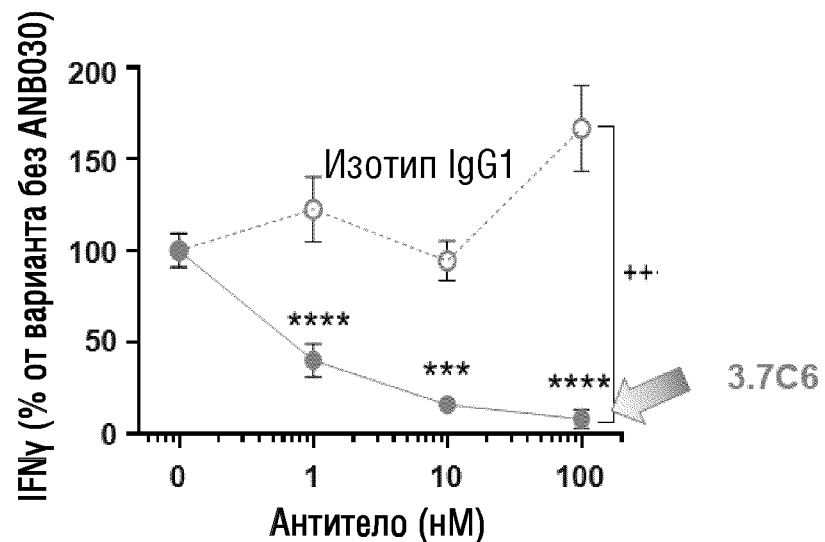


Вращение на 90°



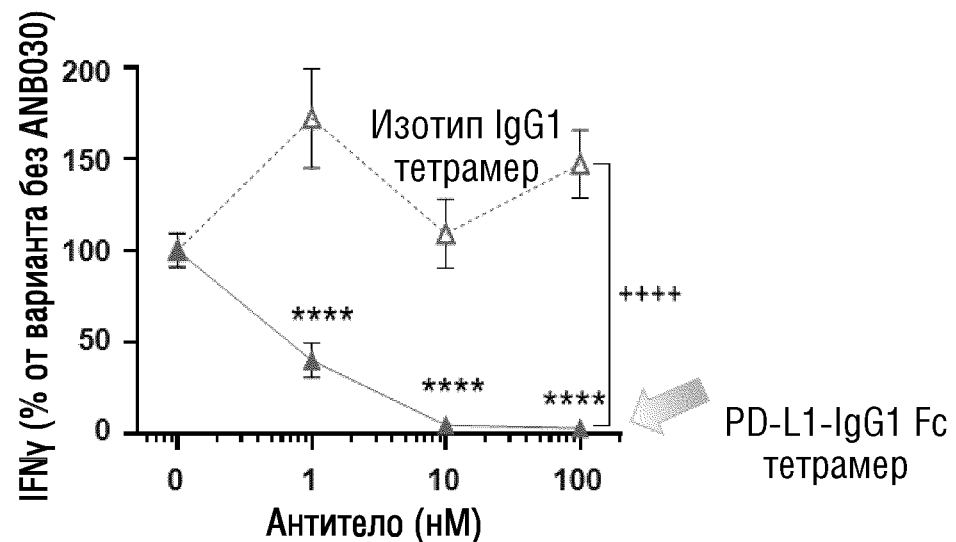
ФИГ.21А

Пул 1 кератиноцитарного антигена,
секретируемый IFN γ (День 5)
Нормализованные результаты от 12 доноров



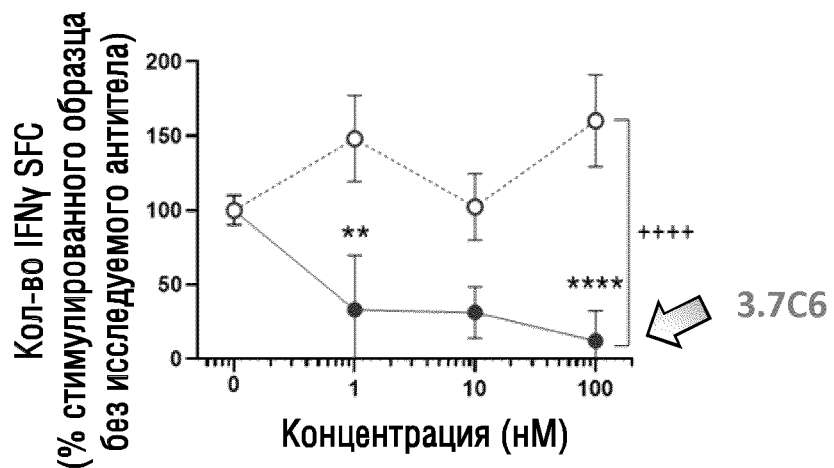
ФИГ.21В

Пул 1 кератиноцитарного антигена,
секретируемый IFN γ (День 5)
Нормализованные результаты от 12 доноров



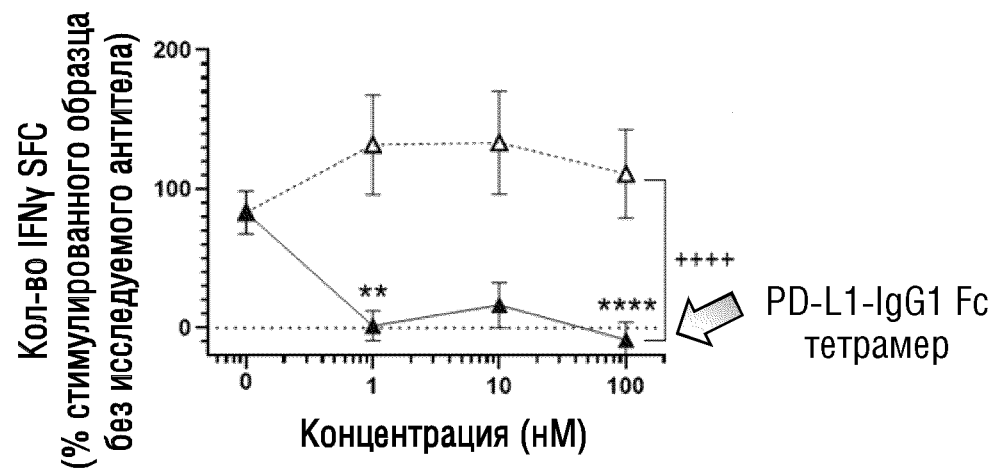
ФИГ.21С

Пул 1 кератиноцитарного антигена
 Количество IFN γ SFC (День 5 + 20 часов)
 Нормализованные результаты от 12 доноров



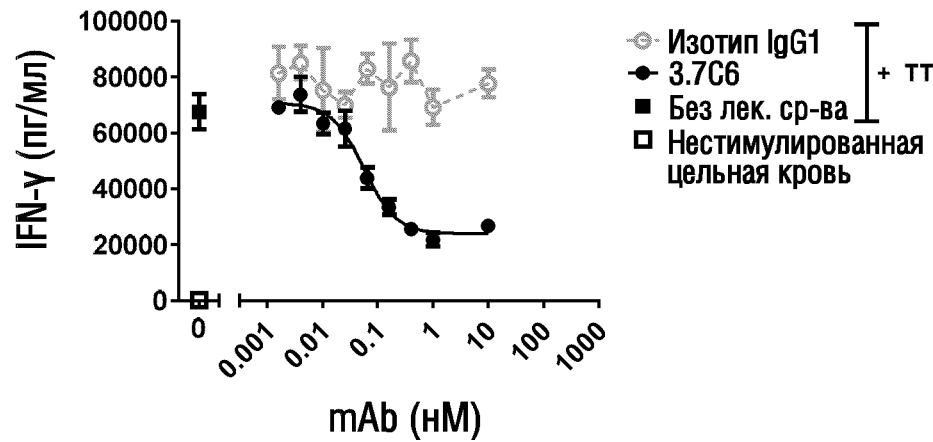
ФИГ.21D

Пул 1 кератиноцитарного антигена
 Количество IFN γ SFC (День 5 + 20 часов)
 Нормализованные результаты от 12 доноров



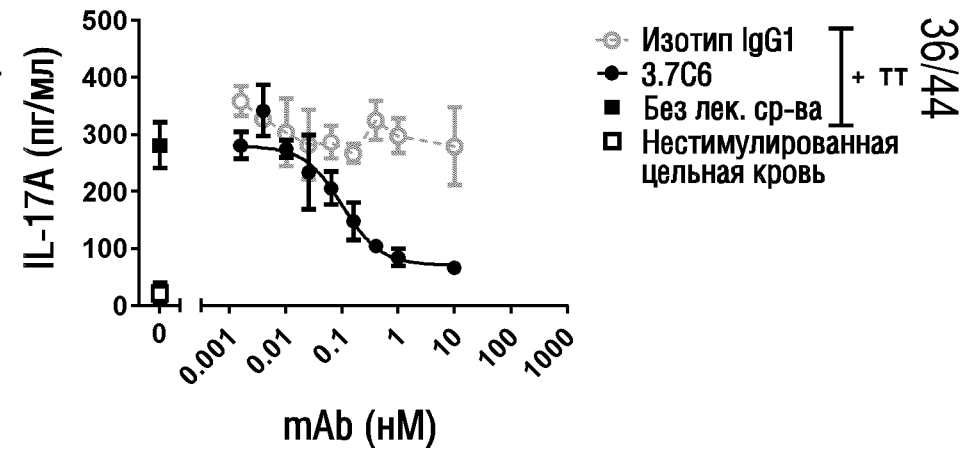
ФИГ.22А

Ингибирование секреции IFN γ с помощью 3.7C6 в анализе вторичного специфичного ответа на антигена столбнячного анатоксина с использованием цельной крови здоровых индивидуумов



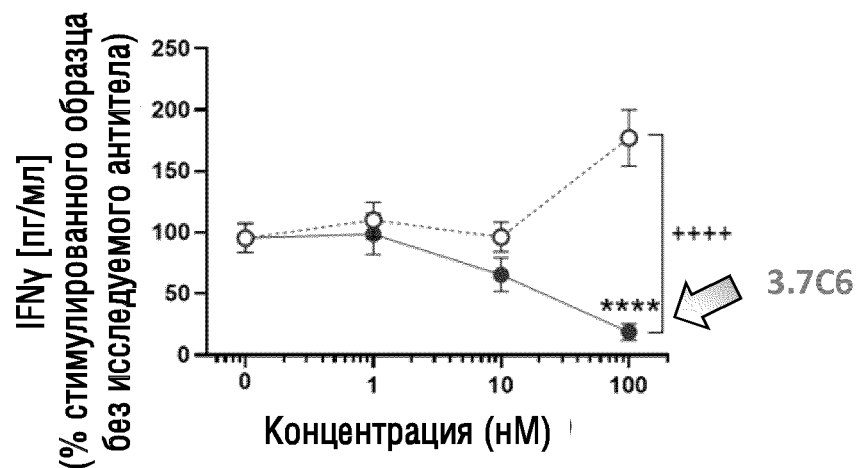
ФИГ.22В

Ингибирование секреции IL-17A с помощью 3.7C6 в анализе вторичного специфичного ответа на антигена столбнячного анатоксина с использованием цельной крови здоровых индивидуумов



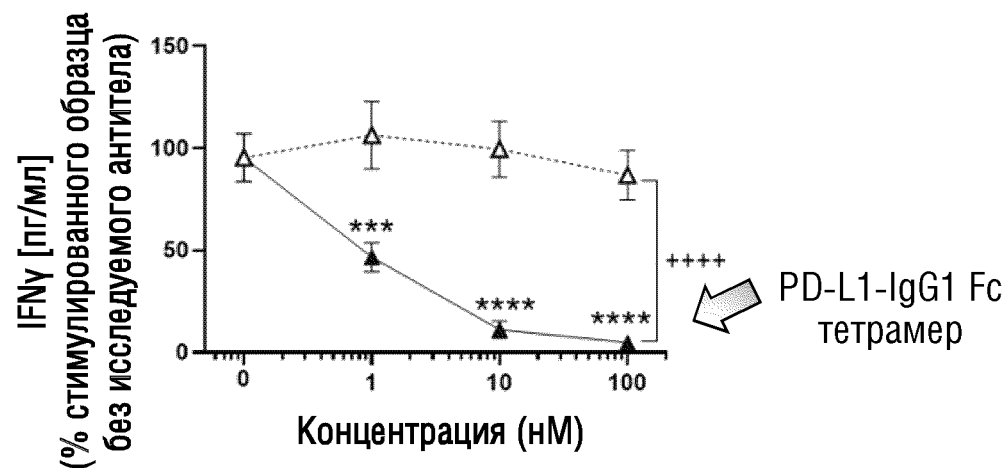
ФИГ.23А

Пул 3 меланоцитарного антигена
Секретируемый IFN γ (День 5)
Нормализованные результаты от 12 доноров



ФИГ.23В

Пул 3 меланоцитарного антигена,
Секретируемый IFN γ (День 5)
Нормализованные результаты от 12 доноров

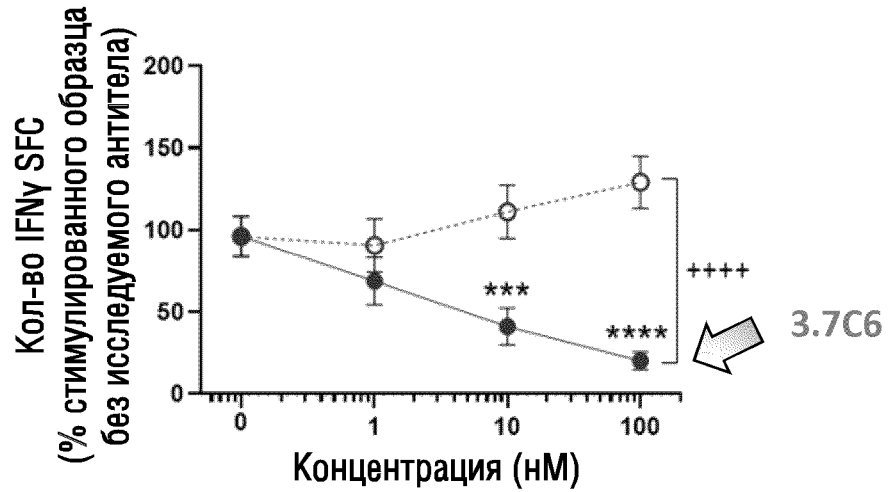


37/44

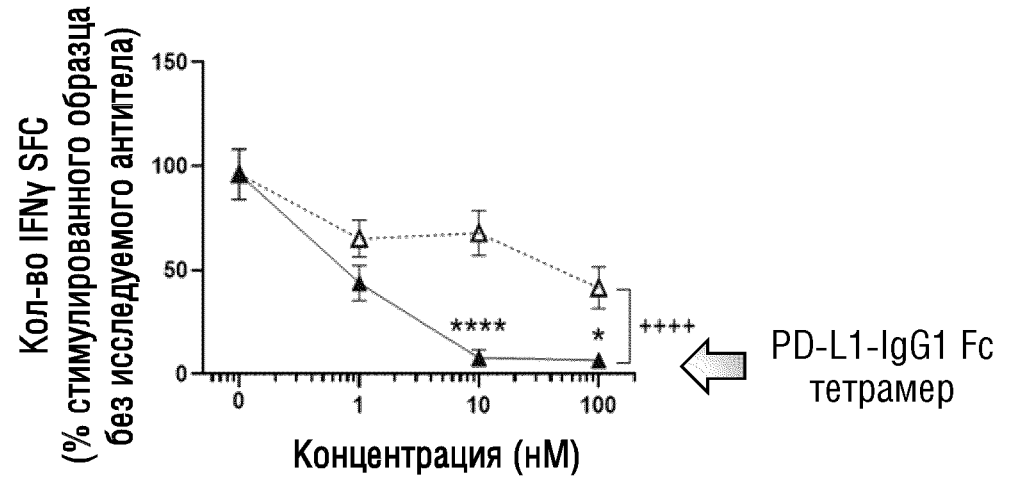
ФИГ.23С

ФИГ.23D

Пул 3 меланоцитарного антигена
Количество IFN γ SFC (День 5 + 20 часов)
Нормализованные результаты от 12 доноров



Пул 3 меланоцитарного антигена
Количество IFN γ SFC (День 5 + 20 часов)
Нормализованные результаты от 12 доноров



38/44

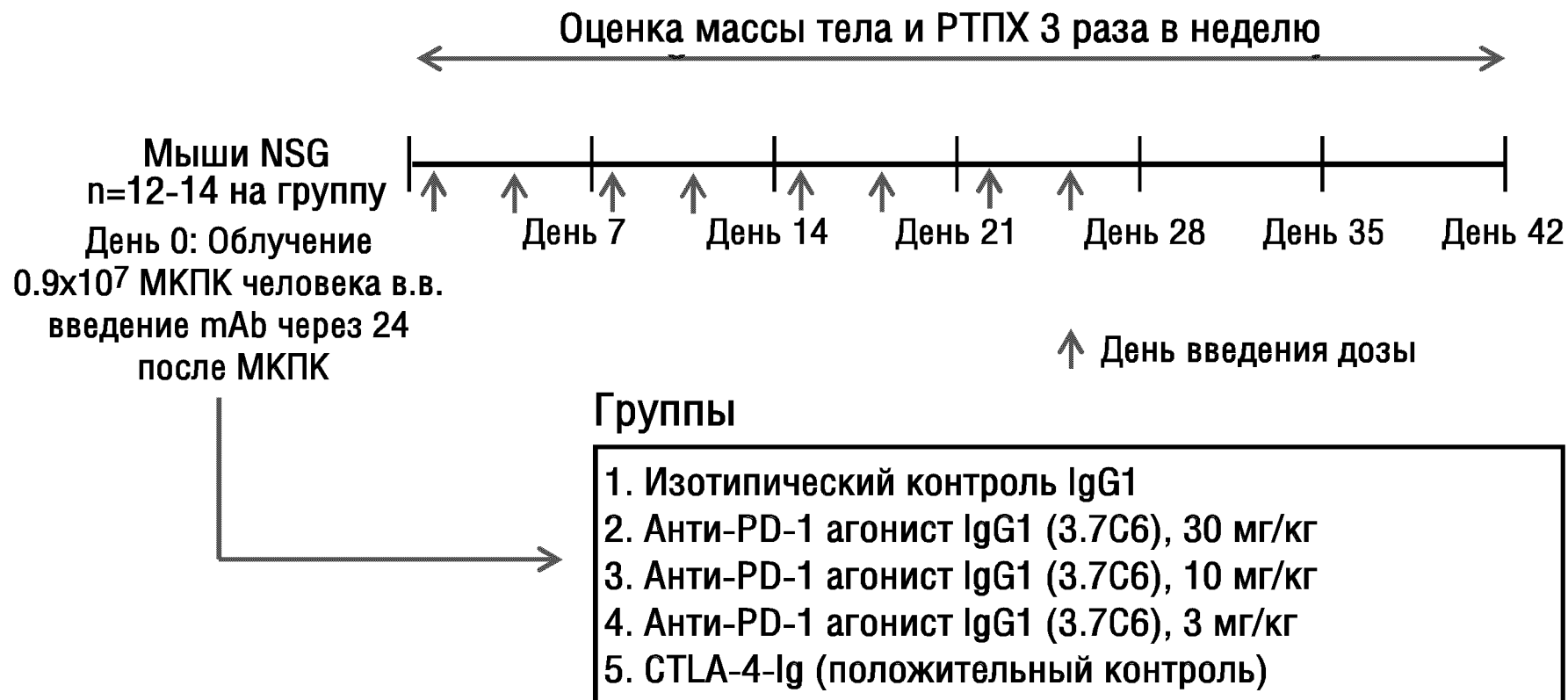
ФИГ.24А



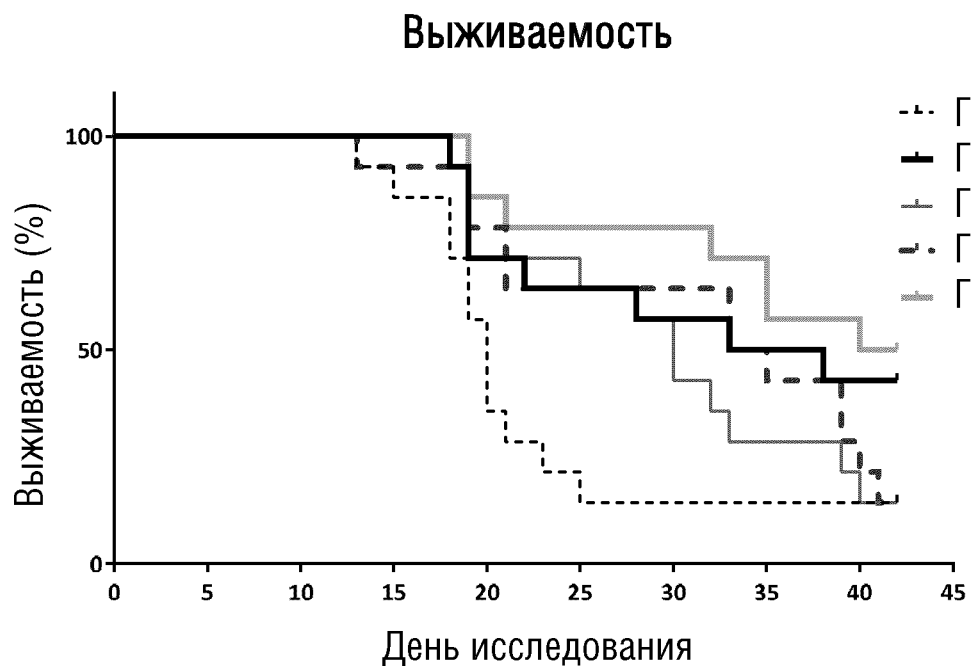
Конечные критерии оценки:

- Потеря веса (-20%)
- Смерть
- Баллы РТПХ

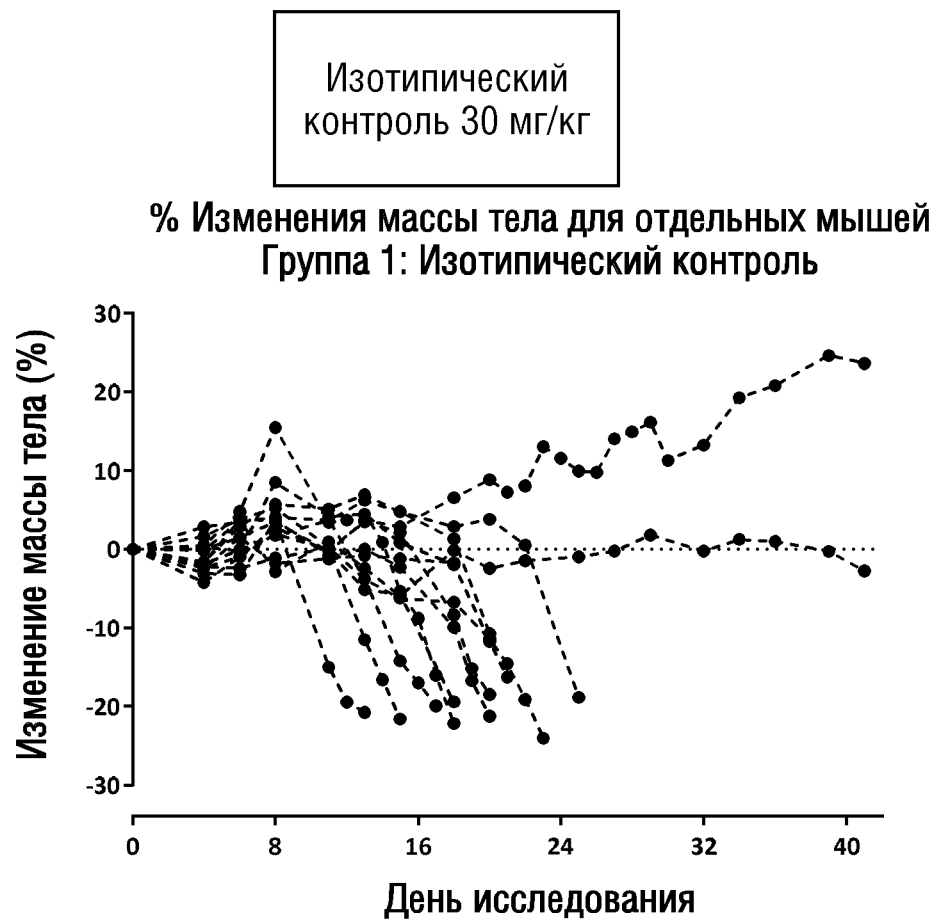
ФИГ.24В



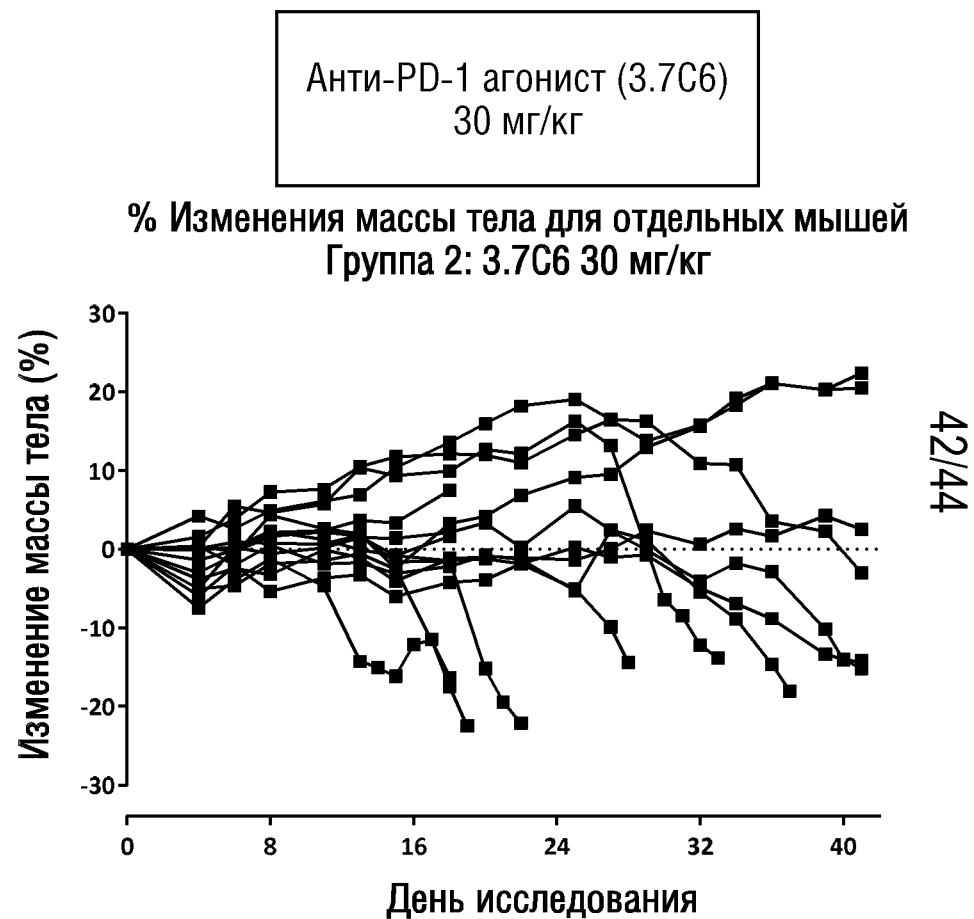
ФИГ.24С



ФИГ.24D



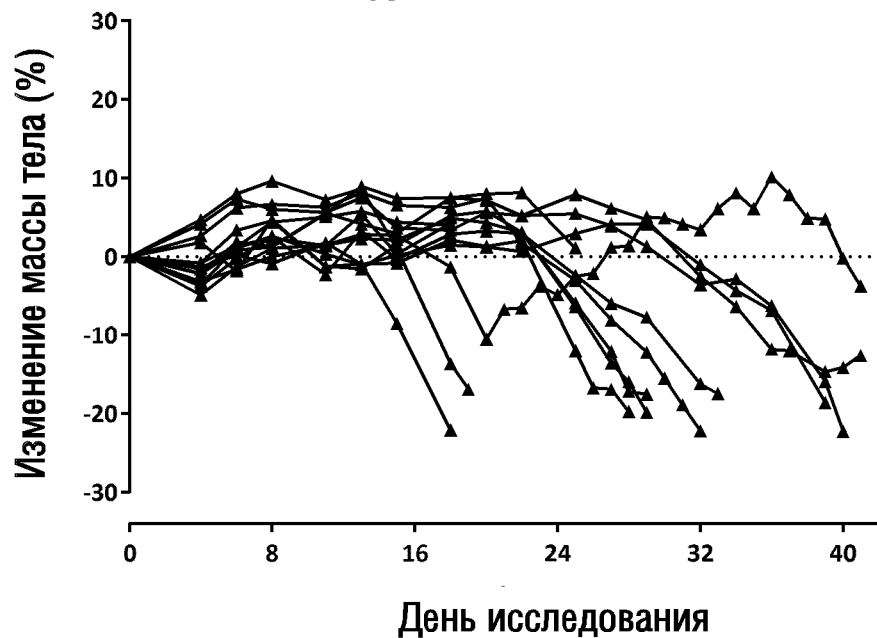
ФИГ.24E



ФИГ.24F

Анти-PD-1 агонист (3.7C6)
10 мг/кг

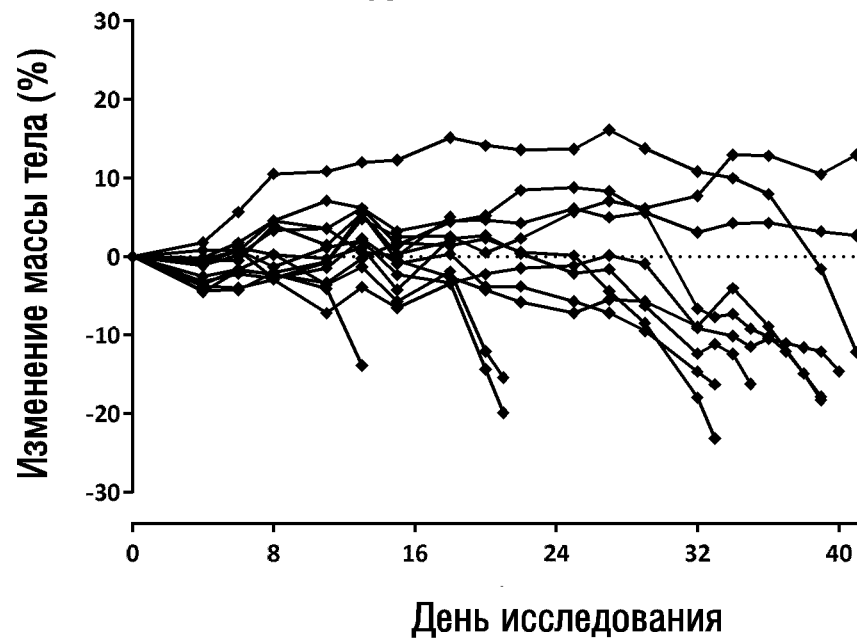
% Изменения массы тела для отдельных мышей
Группа 3: 3.7C6 10 мг/кг



ФИГ.24G

Анти-PD-1 агонист (3.7C6)
3 мг/кг

% Изменения массы тела для отдельных мышей
Группа 4: 3.7C6 3 мг/кг



43/44

ФИГ.24Н

