

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290458** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.05.13

(22) Дата подачи заявки
2020.07.31

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛО ПРОТИВ PD-1 И ЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **201910711138.5; 201911105711.4;
201911105715.2; 201911133858.4**
(32) **2019.08.02; 2019.11.13; 2019.11.13;
2019.11.19**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2020/106219**

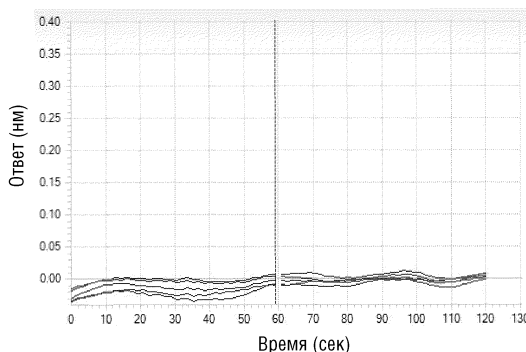
(87) **WO 2021/023108 2021.02.11**

(71) Заявитель:
**СТТК-АКЕСО (ШАНХАЙ)
БАЙОМЕД. ТЕК. КО., ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:
**Ван Чжунминь, Чжан Пэн, Ли Байюн,
Ся Юй (CN)**

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

(57) Изобретение относится к области лечения опухолей и молекулярной иммунологии и, в частности, к антителу против PD-1 и его фармацевтическому применению. В частности, настоящее изобретение относится к моноклональному антителу, где переменная область тяжелой цепи моноклонального антитела содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 19-21 и/или переменная область легкой цепи моноклонального антитела содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 22-24; где по системе нумерации EU константная область тяжелой цепи антитела содержит мутации в любых 2 или 3 из положений 234, 235 и 237, и константа аффинности антитела к FcγRIIIa и/или C1q снижается после мутации по сравнению с аффинностью до мутации. Моноклональное антитело по настоящему изобретению может хорошо и специфически связываться с PD-1, специфически ослаблять иммуносупрессию PD-1 в организме и активировать Т-лимфоциты.



A1

202290458

202290458

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573093EA/019

АНТИТЕЛО ПРОТИВ PD-1 И ЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области лечения опухолей и молекулярной иммунологии, и в частности, к антителу против PD-1 и его фармацевтическому применению. Более конкретно, настоящее изобретение относится к мутантным антителам против PD-1.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Трансмембранный рецептор PD-1 (белок программируемой гибели клеток 1) является членом семейства CD28 и экспрессируется в активированных Т-клетках, В-клетках и миелоидных клетках. Оба лиганда PD-1, PDL1 (лиганд 1 белка программируемой гибели клеток 1 или PDL-1) и PDL2 (лиганд 2 белка программируемой гибели клеток 1 или PDL-2), являются членами суперсемейства B7. PDL1 экспрессируется в различных клетках, включая Т-клетки, В-клетки, эндотелиальные клетки и эпителиальные клетки, и PDL2 экспрессируется только на антигенпрезентирующих клетках, таких как дендритные клетки и макрофаги.

Путь передачи сигнала PD-1/PDL1 играет важную роль в регуляции иммунологической толерантности, микробной инфекции и уклонении опухоли от иммунного надзора. PD-1, в основном, экспрессируется в иммунных клетках, таких как Т-клетки, и лиганд PDL1 PD-1 высоко экспрессируется во многих опухолевых тканях человека. Блокирование пути передачи сигнала PD-1/PDL1 может активировать ингибированные Т-клетки, которые, таким образом, атакуют злокачественные клетки. Блокирование передачи сигнала PD-1/PDL1 может способствовать пролиферации специфических в отношении опухолевого антигена Т-клеток, активировать уничтожение опухолевых клеток и дополнительно ингибировать локальный рост опухоли (Julie R et al., 2012, N Engl J Med., 366:2455-2465).

PD-1/PD-L1 является важной специфической иммунной контрольной точкой. Образование комплекса PD-1/PD-L1 приводит к передаче ингибиторных сигналов и отрицательно регулирует иммунный ответ Т-клеток. Он ингибирует TCR-опосредованную активацию Т-клеток, продукцию цитокинов и пролиферацию Т-клеток (Fife et al., (2011) Nature Immunology 10:1185-1193), индуцирует истощение или анергию гомологичных антиген-специфических Т-клеток (Hofmeyer et al., (2011) Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011:1-9), способствует дифференцировке Th1-клеток в Foxp3⁺ регуляторные Т-клетки (Armanath et al., (2011) Science Trans. Med., 3:1-13; Francisco et al., (2009) J. Exp. Med., 206:3015-3029) и индуцирует апоптоз эффекторных Т-клеток. Разрушение генов PD-L1 приводит к подвергнутому положительной регуляции Т-клеточному ответу и образованию аутореактивных Т-клеток (Latchman et al., (2004) PNAS, 101:10691-10696). Блокада PD-1 или PD-L1 с помощью антитела приводит к повышенному противоопухолевому иммунитету (Iwai et al., (2002) PNAS, 99:12293-12297).

Приблизительно за последние 20 лет исследователи приложили значительные усилия для разработки специфического ингибитора иммунных контрольных точек, ожидая получения новых иммунотерапевтических способов для лечения злокачественных новообразований. Кроме того, врожденная Т-лимфоцитарная иммунная система может отвечать на множество опухолевых антигенов вследствие своей высокой противоопухолевой активности и широкой и точной специфичности. Эта развивающаяся иммунотерапия злокачественных новообразований повышает противоопухолевый иммунный ответ благодаря адаптивному переносу активированных эффекторных клеток, иммунизации простив соответствующих антигенов или введению неспецифических иммуностимуляторов. Таким образом, PD-1/PD-L1-специфическим ингибиторы иммунных контрольных точек обладает потенциалом в лечении соответствующих злокачественных новообразований.

Механизм действия антител против PD-1 является блокирование связывания белков PD-1 на поверхности иммунных клеток с его лигандами PDL1 или PDL2 и активация иммунных клеток для уничтожения опухоли. В настоящее время все еще сохраняется потребность в разработке нового антитела против PD-1 для снижения или устранения повреждения, вызванного антителоопосредованной активностью ADCC, ADCP и/или CDC, в отношении иммунных клеток, с которыми связывается антитело против PD-1, и улучшения эффективности терапии антителами.

Термин "ADCC" (антителозависимая клеточная цитотоксичность) относится к уничтожению клетки-мишени киллерной клеткой (NK-клеткой, макрофагом и т.д.), опосредованному связыванием Fab-фрагмента антитела с эпитопом инфицированной вирусом клетки или опухолевой клетки и связыванием Fc-фрагмента антитела с Fc-рецептором (FcR) на поверхности киллерной клетки.

Термин "CDC" (обусловленная комплементом цитотоксичность) относится к литическому эффекту в отношении клеток-мишеней под действием мембраноатакующего комплекса, образованного посредством серийного связывания антитела с соответствующими антигенами на поверхностях клеточных мембран и компонента комплемента C1q, и активации C2-C9.

Fc-рецепторы являются членами семейства иммуноглобулинов, экспрессирующимися на поверхности конкретных иммунных клеток для распознавания Fc-областей антител и опосредования иммунных ответов. После распознавания антигена Fab-областью Fc-область антитела связывается с Fc-рецептором на иммунной клетке (например, киллерной клетке), инициируя функцию ответа иммунной клетки, такую как фагоцитоз и ADCC.

В зависимости от типа антитела, распознаваемого Fc-рецептором, и типа экспрессирующих клеток, Fc-рецепторы, в основном, классифицируют на три типа, FcγR, FcαR и FcεR. FcγR можно дополнительно разделять на четыре подтипа, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) и FcRn (неонатальный Fc-рецептор). Из них FcγRI, FcγRII и FcγRIII сильно ассоциированы с эффектом ADCC. FcγRIII является наиболее

преобладающей молекулой, опосредующей ADCC, с двумя высокомолекулярными подтипами, FcγRIIIa и FcγRIIIb, в разных типах клеток. В группах FcγRIIIa есть два подтипа, отличающиеся участками однонуклеотидного полиморфизма (SNP), FcγRIIIa_V158 с высокой аффинностью и FcγRIIIa_F158 с низкой аффинностью. FcγRI имеет более высокую аффинность к Fc-области IgG и участвует в ADCC; FcγRII включает три подтипа, FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIc (также обозначаемый как CD32a, CD32b и CD32c, соответственно), среди которых FcγRIIa обладает активностью ADCC; в случае FcγRIIa в результате однонуклеотидной мутации у людей существует два подтипа, FcγRIIa_H131 и FcγRIIa_R131; FcγRIIb является ингибиторным рецептором и типичным ингибиторным FcγR, ингибирующим близлежащие пути ITAM. Например, после связывания иммунного комплекса с BCR, Fc-фрагмент связывается с FcγRIIb на той же клетке, отрицательно регулируя активацию В-клеток и снижая секрецию антител и цитокинов (Hogarth PM, Pietersz GA., 2012, NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, 11(4):311-331).

Семейство IgG включает четыре члена, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, отличающиеся аминокислотами в области кристаллизуемого фрагмента (Fc) константной области тяжелой цепи, что приводит к их разной аффинности к FcγR. IgG1 является наиболее преобладающим подтипом у людей, а также наиболее распространенным подтипом, используемым в лекарственных средствах на основе моноклональных антител. IgG1 может связываться с различными FcγR и индуцировать эффекты ADCC и CDC. IgG2 имеет наименьшую аффинность к FcγR, но все равно может индуцировать моноцит-опосредованную ADCC посредством связывания с FcγRIIa. IgG3 проявляет наибольшую связывающую способность в отношении FcγR и может индуцировать ADCC и более высокий эффект CDC, чем IgG1. Молекулы IgG4 демонстрируют слабое связывание с иными FcγR, чем FcγRI, что приводит к меньшей вероятности индуцирования CDC и опосредованной NK-клетками ADCC. Однако антитела подтипа IgG4 могут опосредовать эффекты ADCP посредством связывания с FcγRI, и эффекты ADCP, наблюдаемые в случае антителных терапевтических средств, нацеленных на иммунные клетки, могут вызывать повреждение иммунных клеток, приводя к фармакологическим неблагоприятным эффектам.

Zhang et al. (Zhang T et al, Cancer Immunol Immunother., 2018; 67(7):1079-1090) and Dahan et al. (Dahan R et al., Cancer cell, 2015, 28(3):285-95) описывали, что связывание Fc-фрагментов антител, нацеленных на иммунные контрольные точки, такие как PD-1 и CTLA-4, с Fc-рецепторами отрицательно влияет на антитело-опосредованную противоопухолевую активность, вероятно, из-за индуцированного Fc-зависимой эффекторной функции повреждения, включая антителозависимую клеточную цитотоксичность, где антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) является важным механизмом, приводящим к повреждению иммунных клеток.

Неплоскоклеточный немелкоклеточный рак легких (NSCLC) и плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких (sNSCLC) являются злокачественными новообразованиями тканей легких. Существующие терапевтические стратегии включают хирургическое

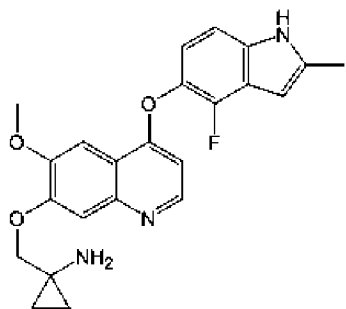
вмешательство на ранней стадии. Тем не менее, большинство диагностированных пациентов с раком легких имеют позднюю стадию, демонстрируя плохой ответ на хирургическое вмешательство и лучевую терапию. Таким образом, химиотерапия стала важным вариантом лечения. В настоящее время, комбинированная химиотерапия соединениями платины и другими химиотерапевтическими средствами все еще является химиотерапией первой линии для рака легких, включая sNSCLC and NSCLC на поздней стадии (Pfister DG. et al., J. Clin. Oncol., 2003, 22:330; De Ruysscher et al., (2006) *Annals of Oncology*, 17:543-552).

В настоящее время химиотерапию, в основном, разделяют на следующие девять классов (He Jie, et al., *Clinical Oncology*, Beijing, People's Medical Publishing House, 2016:230-237). Первым классом являются лекарственные средства, напрямую связывающиеся с ДНК и предотвращающие репликацию ДНК, включающие различные алкилирующие средства, митомицин, блеомицин, дакарбазин, лекарственные средства на основе платины (например, цисплатин и карбоплатин), камптотецины и их производные. Вторым классом являются лекарственные средства для предотвращения биосинтеза нуклеиновых кислот, влияющие, в основном, на ферментативную систему опухолевых клеток и блокирующие синтез предшественников ДНК и РНК, и, таким образом, ингибирующие образование ДНК или РНК, включающие метотрексат, фторурацил, 6-меркаптопурин, гидроксимочевину и цитарабин; такие лекарственные средства, в основном, действуют на клетки в S-фазе и являются антиметаболитами и специфическими в отношении клеточного цикла противоопухолевыми лекарственными средствами. Третьим классом являются химиотерапевтические лекарственные средства, влияющие на транскрипцию посредством фармакологического механизма таким образом, что лекарственные средства встраиваются в двойную спираль ДНК с образованием нековалентной связи с двойной спиралью ДНК, что противодействует транскрипции генетической информации на ДНК в ДНК-зависимую мРНК и вызывает нарушение функционирования матрицы и пространственно-затрудненную транскрипцию. Четвертым классом являются средства, влияющие на тубулин и митоз, включающие алкалоиды барвинка, подофиллотоксины и таксаны. Пятым классом являются лекарственные средства, влияющие на функцию рибосом и блокирующие синтез белка; типичными такими лекарственными средствами являются харрингтонины, ингибирующие инициацию синтеза белка, разрушение рибосомы и высвобождение новой пептидной цепи, но не блокирующие связывание мРНК и тРНК с рибосомами; такие лекарственные средства вызывают уменьшение ядерной ДНК и цитоплазматической РНК и деполимеризацию полисом и ингибируют митоз. Шестым классом являются лекарственные средства, влияющие на мембрану опухолевых клеток, такие как конканавалин (Con-A) и фитогемагглютинин (РНА); они могут связываться с гликопротеиновыми рецепторами на клеточной мембране, таким образом, влияя на синтез ДНК в опухолевых клетках и предотвращая деление опухолевых клеток. Седьмым классом являются лекарственные средства, индуцирующие апоптоз, такие как триоксид мышьяка. Восьмым классом

являются гормоны, с помощью которых лечат опухоли посредством регуляции эндокринной системы, включая эстрогены, антиэстрогены, прогестогены, андрогены, антиандрогены, кортикостероиды и антикортикостероиды (включая дихлордифенилдихлорэтан и аминоклотедин). Девятым классом является противоопухолевая таргетированная терапия, включающая моноклональные антитела, ингибиторы передачи сигнала эпидермального фактора роста (например, таргетированные лекарственные средства против пути акцепторной тирозинкиназы), ингибиторы убиквитин-протеасом и ингибиторы ангиогенеза. Тем не менее, в дополнение к уничтожению опухолевых клеток, химиотерапевтические средства также повреждают нормальные клетки человека, таким образом, общепринятые схемы химиотерапии для пациентов со злокачественными новообразованиями зачастую вызывают серьезные токсические и побочные эффекты. Что более важно, в дополнение к очевидной токсичности, химиотерапевтические средства демонстрируют лишь кратковременный контроль над заболеваниями и низкую 5-летнюю выживаемость у пациентов, которым вводят химиотерапевтические средства. Таким образом, разработка лекарственного средства или комбинированной терапии с более низкой токсичностью и более высокой эффективностью имеет большое значение.

Анлотиниб является хинолиновым производным ингибитора тирозинкиназ. В качестве многоцелевого ингибитора тирозинкиназ (TKI), он влияет на передачу сигналов ангиогенеза и пролиферации опухолей. Основные мишени включают: рецепторные тирозинкиназы рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) 1-3, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецепторы фактора роста фибробластов (FGFR) 1-4, α - и β -рецепторы тромбоцитарного фактора роста (PDGFR) и рецепторы фактора стволовых клеток (SCFR) 7, 8 и 9. Исследование фазы 2 показало, что анлотиниб улучшал выживаемость без прогрессирования с потенциальной пользой для общей выживаемости (Han B, et al., Br J Cancer, 2018; 118(5):654-661). Многоцентровое, двойное слепое, рандомизированное клиническое испытание фазы 3 показало, что анлотиниб приводил к увеличенной общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования у пациентов в Китае. Результаты позволяли предполагать, что анлотиниб хорошо переносился и является потенциальным препаратом третьей линии или дополнительным лечением для пациентов с NSCLC на поздней стадии (Han B, et al., JAMA Oncol., 2018 Nov.; 4(11):1569-1575).

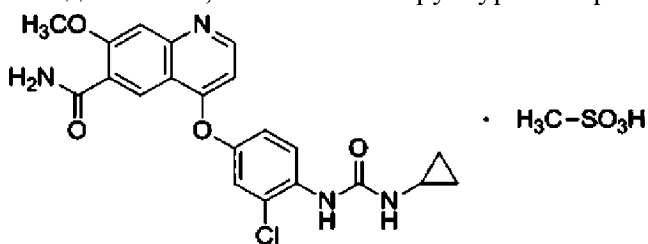
В примере 24 патента № WO2008112407 описан полученный из хинолина ингибитор тирозинкиназ 1-[[[4-(4-фтор-2-метил-1H-индол-5-ил)окси-6-метоксихинолин-7-ил]окси]метил]циклопропиламин и способ его получения. Структурная формула полученного из хинолина ингибитора тирозинкиназ представлена как формула I. Гидрохлорид анлотиниба является гидрохлоридом соединения формулы I.



Формула I

Ленватиниб, пероральный множественный ингибитор тирозинкиназ, разработанный Eisai (Japan), является многоцелевым ингибитором рецепторных тирозинкиназ, ингибирующим киназную активность VEGFR1 (FLT1), VEGFR2 (KDR) и VEGFR3 (FLT4). В дополнение к нормальной функции клеток, ленватиниб также ингибирует другие рецепторные тирозинкиназы, участвующие в патогенном ангиогенезе, росте опухоли и прогрессировании злокачественных новообразований, включая рецепторы фактора роста фибробластов (FGF) FGFR1, FGFR2, FGFR3 и FGFR4, рецептор "реаранжированный во время трансфекции" (RET), KIT и α -рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR α). Ленватиниб также демонстрирует антипролиферативную активность в линиях клеток печеночноклеточной карциномы, зависящую от передачи сигнала активированного FGFR и одновременного ингибирования фосфорилирования субстрата 2 α рецептора FGF (FRS2 α).

Структура ленватиниба, 4-(3-хлор-4(циклопропиламинокарбонил)аминофенокси)-7-метокси-6-хинолинкарбоксамида, описана в примере 368 патента США № 7612208. В патенте США № 7253286 описана мезилатная форма ленватиниба (т.е. мезилат ленватиниба), названная 4-[3-хлор-4-(циклопропилуреидо)фенокси]-7-метоксихинолин-6-карбоксамидамезилата, химическая структура которой приведена ниже (формула II):



Формула II

Однако в случае различных опухолей заболевание все еще является неконтролируемым в течение длительного времени после химиотерапии, а 5-летняя выживаемость все еще является очень низкой. Таким образом, большое значение является разработка лекарственного средства или комбинированного лечения с более низкой токсичностью и более высокой эффективностью.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Посредством интенсивных исследований и творческих усилий авторы настоящего изобретения соответствующим образом модифицировали Fc-фрагмент структуры антитела против PD-1 для снижения связывающей способности Fc-области в отношении Fc-рецепторов, таким образом, снижая эффекты ADCC, ADCP и/или CDC в отношении Т-

клеток и повышая эффективность антитела против PD-1. Настоящее изобретение подробно описано ниже.

Один из аспектов настоящего изобретения относится к антителу, где

вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 19-21, соответственно, и вариабельная область легкой цепи антитела содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 22-24, соответственно;

антитело принадлежит подтипу IgG1 человека;

где по системе нумерации EU константная область тяжелой цепи антитела содержит мутации в любых 2 или 3 из положений 234, 235 и 237, и константа аффинности антитела к FcγRIIIa и/или C1q снижается после мутации по сравнению с аффинностью до мутации; предпочтительно, константу аффинности измеряют с помощью системы Fortebio Octet.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело является моноклональным антителом. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело является антителом против PD-1, предпочтительно, моноклональным антителом против PD-1.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, в случае антитела, по системе нумерации EU константная область тяжелой цепи антитела содержит следующие мутации в положениях 234, 235 и/или 237:

L234A и L235A;

L234A и G237A;

L235A и G237A;

или

L234A, L235A и G237A.

В настоящем изобретении, если не указано иначе, буквы перед номером положения соответствуют аминокислотам до мутации, и буквы после номера положения соответствуют аминокислотам после мутации.

Настоящее изобретение также относится к антителу, где

вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 19-21, соответственно, и вариабельная область легкой цепи антитела содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 22-24, соответственно;

антитело принадлежит подтипу IgG1 человека;

где по системе нумерации EU константная область тяжелой цепи антитела содержит следующие мутации в положениях 234, 235 и/или 237:

L234A и L235A;

L234A и G237A;

L235A и G237A; или
L234A, L235A и G237A.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения по системе нумерации EU константная область тяжелой цепи антитела дополнительно содержит одну или более мутаций, выбранных из:

N297A, D265A, D270A, P238D, L328E, E233D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, T394D, G236R, G236A, L328R, A330S, P331S, H268A, E318A и K320A.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, в случае антитела переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 6; и переменная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, в случае антитела, переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, и переменная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4;

переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, и переменная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8;

переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, и переменная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4; или

переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, и переменная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, в случае антитела, тяжелая цепь приведена в SEQ ID NO: 16, и легкая цепь приведена в SEQ ID NO: 12;

или
тяжелая цепь приведена в SEQ ID NO: 18, и легкая цепь приведена в SEQ ID NO: 12.

Переменные области легкой цепи и тяжелой цепи определяют связывание антигена; переменная область каждой цепи содержит три гиперпеременные области, т.е. определяющие комплементарность области (CDR) (CDR тяжелой цепи (H) включают HCDR1, HCDR2, HCDR3, и CDR легкой цепи (L) включают LCDR1, LCDR2, LCDR3; определенные Kabat et al., см. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (1991), Volumes 1-3, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD).

Аминокислотные последовательности областей CDR моноклонального антитела в (1)-(3) выше анализируют техническими способами, хорошо известными специалистам в этой области, например, с помощью базы данных VBASE2:

Антитела 14C12, 14C12H1L1(hG1WT), 14C12H1L1(hG1DM) и 14C12H1L1(hG1TM) по настоящему изобретению имеют одни и те же CDR.

Аминокислотные последовательности 3 областей CDR переменной области тяжелой цепи являются следующими:

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 19),

HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 20) и

HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 21).

Аминокислотные последовательности 3 областей CDR переменной области легкой цепи являются следующими:

LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO: 22),

LCDR2: RAN (SEQ ID NO: 23) и

LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 24).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело связывается с FcγRIIIa_F158, FcγRI, FcγRIIIa_H131, FcγRIIIa_V158 и/или FcγRIIb с константой аффинности более приблизительно 10^{-7} М, например, более приблизительно 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М или более; предпочтительно, константу аффинности измеряют с помощью системы Fortebio Octet;

предпочтительно, антитело не имеет сигнала связывания или имеет сигнал связывания менее 0,1 нм в отношении FcγRIIIa_F158, FcγRI, FcγRIIIa_H131, FcγRIIIa_V158 и/или FcγRIIb; предпочтительно, термин "сигнал связывания" относится к ответу, измеряемому с помощью системы Fortebio Octet.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело связывается с C1q с константой аффинности более приблизительно 10^{-9} М, например, более приблизительно 10^{-8} М, 10^{-7} М, 10^{-6} М, 10^{-5} М или более; предпочтительно, константу аффинности измеряют с помощью системы Fortebio Octet;

предпочтительно, антитело не имеет сигнала связывания или имеет сигнал связывания менее 0,1 нм в отношении C1q; предпочтительно, термин "сигнал связывания" относится к ответу, измеряемому с помощью системы Fortebio Octet.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело является моноклональным антителом.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело является гуманизированным антителом.

Другой аспект настоящего изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело по любому варианту осуществления настоящего изобретения.

Другой аспект настоящего изобретения относится к вектору, содержащему выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или вектор по настоящему изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к конъюгату, содержащему антитело и конъюгированный остаток, где антитело является антителом по любому варианту осуществления настоящего изобретения, и конъюгированный остаток является детектируемой меткой; предпочтительно, конъюгированный остаток является радиоактивным изотопом, флуоресцентным веществом, люминесцентным веществом, цветным веществом или ферментом.

Другой аспект настоящего изобретения относится к набору, содержащему антитело по любому варианту осуществления настоящего изобретения или содержащему конъюгат по настоящему изобретению;

предпочтительно, набор дополнительно содержит второе антитело, специфически распознающее антитело; необязательно, второе антитело дополнительно содержит детектируемую метку, например, радиоактивный изотоп, флуоресцентное вещество, люминесцентное вещество, цветное вещество или фермент.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению антитела или конъюгата по любому варианту осуществления настоящего изобретения в получении набора для детекции наличия или уровня PD-1 в образце.

Другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей биспецифическое антитело или конъюгат по любому варианту осуществления настоящего изобретения; необязательно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит одно или более противоопухолевых химиотерапевтических средств;

предпочтительно, противоопухолевое химиотерапевтическое средство является ингибитором тирозинкиназ; более предпочтительно, противоопухолевое химиотерапевтическое средство является анлотинибом или его фармацевтически приемлемой солью (например, гидрохлоридом) или ленватинибом или его фармацевтически приемлемой солью (например, мезилатом).

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения однократная доза фармацевтической композиции составляет 100-1000 мг, 200-800 мг, 200-500 мг, 300-600 мг, 400-500 мг или 450 мг с учетом массы антитела.

Другой аспект настоящего изобретения относится к терапевтической комбинации, содержащей: антитело по любому варианту настоящего изобретения и по меньшей мере одно (например, 1, 2 или 3) противоопухолевое химиотерапевтическое средство.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения в случае терапевтической комбинации противоопухолевое химиотерапевтическое средство является ингибитором тирозинкиназ; предпочтительно, противоопухолевое химиотерапевтическое средство является анлотинибом или его фармацевтически

приемлемой солью (например, гидрохлоридом) или ленватинибом или его фармацевтически приемлемой солью (например, мезилатом).

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения в случае терапевтической комбинации однократная доза антитела составляет 100-1000 мг, 200-800 мг, 200-500 мг, 300-600 мг, 400-500 мг или 450 мг.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения в случае терапевтической комбинации однократная доза противоопухолевого химиотерапевтического средства составляет 0,1-100 мг, 0,5-50 мг, 0,5-10 мг, 1-10 мг, 2-8 мг или 1-5 мг.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения в случае терапевтической комбинации однократная доза противоопухолевого химиотерапевтического средства составляет 1-20 мг, 2-15 мг, 4-12 мг или 8-12 мг.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения в случае терапевтической комбинации, где

терапевтическая комбинация является фиксированной комбинацией, например, в форме твердой фармацевтической композиции или жидкой фармацевтической композиции; или

терапевтическая комбинация является нефиксированной комбинацией, например, каждое из антитела против PD-1 и противоопухолевого химиотерапевтического средства в нефиксированной комбинации находится в форме фармацевтической композиции.

Другой аспект настоящего изобретения относится к набору, содержащему фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения или терапевтическую комбинацию по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения и вкладыш в упаковку.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению антитела по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, конъюгата по настоящему изобретения, фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения или терапевтической комбинации по любому варианту осуществления настоящего изобретения в получении лекарственного средства для лечения и/или профилактики опухоли или анемии или в получении лекарственного средства для диагностики опухоли или анемии; где, предпочтительно, опухоль выбрана из одной или более из меланомы, рака почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака толстого кишечника, рака прямой кишки, рака желудка, рака печени, рака легких, рака яичников, лейкоза, рака носоглотки и рака эндометрия;

предпочтительно, рак легких выбран из одного или более из немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких и плоскоклеточного рака легких;

предпочтительно, рак желудка является аденокарциномой желудка или аденокарцинома пищеводно-желудочного соединения;

предпочтительно, опухоль является солидной опухолью фенотипа MSI-H/dMMR; предпочтительно, опухоль выбрана из одной или более из следующих опухолей фенотипа MSI-H/dMMR:

рака толстого кишечника, рака прямой кишки, рака эндометрия, рака желудка, мезотелиомы, саркомы, карциномы коры надпочечников, злокачественной меланомы и эмбрионально-клеточной опухоли яичников.

Термин "MSI" относится к микросателлитной нестабильности. Микросателлиты являются короткими tandemными повторами на всем протяжении генома человека, включающими 10-50 повторов одного, двух или более нуклеотидов. Микросателлиты в некоторых аномальных клетках, таких как опухоли, изменены по длине в результате инсерции или делеции единиц повторов по сравнению с нормальными клетками. Такое изменение обозначают как MSI. Учитывая нестабильность и степень, MSI можно классифицировать как высокую микросателлитную нестабильность (MSI-H), низкую микросателлитную нестабильность (MSI-L) и микросателлитную стабильность (MSS). Основной причиной MSI является недостаточность репарации ошибочно спаренных оснований ДНК (MMR). Гены репарации ошибочно спаренных оснований человека (гены MMR) могут экспрессировать соответствующие белки репарации ошибочно спаренных оснований посредством транскрипции и трансляции. Отсутствие любого белка MMR может приводить к недостаточности репарации ошибочно спаренных оснований, и из-за нее в ходе репликации ДНК будет накапливаться неправильное спаривание оснований, что в конечном итоге приводит к MSI. Приблизительно 15% случаев колоректального рака приписывают пути MSI. Это впервые было описано для колоректального рака, но также может возникать при раке желудка, раке эндометрия, карциноме коры надпочечников и т.п. (Baretti M et al., *PharmacolTher.*, 2018; 189:45-62). В последующих исследованиях также обнаруживали характерные признаки MSI-H/dMMR при мезотелиоме, саркоме, карциноме коры надпочечников, злокачественной меланоме и эмбрионально-клеточной опухоли яичников.

MSI-H и dMMR представляют собой результаты двух разных анализов и биологически согласуются, их называют MSI-H/dMMR или MSI-high/dMMR, в то время как MSI-L и MSS являются фенотипами с повышенной MMR (pMMR). Для детекции dMMR осуществляют иммуногистохимический анализ экспрессии белков для четырех генов репарации ошибочно спаренных оснований MSH2, MLH1, MSH6 и PMS2 на образцах опухоли (включая хирургические препараты и аспирационные биоптаты). Отсутствие любого из четырех белков подтверждает dMMR; положительные результаты для всех четырех белков свидетельствуют о pMMR, т.е. полном функционировании репарации ошибочно спаренных оснований. Детекцию MSI осуществляют посредством сопоставления повторяющихся последовательностей ДНК (последовательностей микросателлитов) в опухолевых клетках и соматических клетках и сравнения их длин. Если 5 стандартных локусов определяют посредством ПЦР на основе американского стандарта NCI, несоответствие двух или более локусов свидетельствует о нестабильности,

определяемой как MSI-H, несоответствие одного локуса свидетельствует о MSI-L, и 5 соответствующих локусов свидетельствуют о MSS. В качестве способа детекции микросателлитной нестабильности также можно использовать высокопроизводительное секвенирование (также обозначаемое как секвенирование нового поколения или NGS). Если для анализа ПЦР выбирают больше микросателлитных локусов, например, более 5 локусов, или дополнительные микросателлитные локусы, несоответствие $\geq 30\%$ локусов определяют как MSI-H, соответствие во всех локусах определяют как MSS, и несоответствие от 0 до 30% определяют как MSI-L.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению антитела по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, конъюгата по настоящему изобретению, фармацевтической композиции по любому варианту осуществления настоящего изобретения или терапевтической комбинации по любому варианту осуществления настоящего изобретения в получении:

лекарственного средства для блокирования связывания PD-1 с PD-L1,
 лекарственного средства для отрицательной регуляции активности или уровня PD-1,

лекарственного средства для уменьшения иммуносупрессии PD-1 в организме или
 лекарственного средства для повышения экспрессии ИФН γ и/или ИЛ-2 в Т-лимфоцитах.

Интерферон γ (ИФН γ) продуцируется, главным образом и врожденно, естественными киллерами (NK) и естественными киллерными Т-клетками (NKT) и продуцируется эффекторными Т-клетками, такими как CD4⁺ Th1-клетки и CD8⁺ цитотоксические Т-клетки, стимулированные специфическими антигенами. В качестве важного цитокина врожденного и приобретенного иммунитета, ИФН γ играет важную роль в противодействии или ингибировании вирусной инфекции и некоторых бактериальных и протозойных инфекционных заболеваний. В то же время, ИФН γ может активировать макрофаги, индуцировать экспрессию главного комплекса гистосовместимости типа II и активировать иммунный ответ для контроля прогрессирования опухоли (Schoenborn JR, Wilson CB., Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses, *Advances in Immunology*, 2007, 96:41-101). В эксперименте *in vitro* по настоящему изобретению антитело по изобретению может индуцировать секрецию ИФН γ для активации иммунного ответа.

Интерлейкин 2 (ИЛ-2) продуцируется Т-клетками. Он является фактором роста, регулирующим субпопуляции Т-клеток, и важным фактором в регуляции иммунных ответов. Он способствует пролиферации активированных В-клеток и участвует в гуморальных ответах, гемопоэзу и иммунном надзоре за опухолями. Рекомбинантный ИЛ-2 человека одобрен FDA США для лечения злокачественных новообразований, включая меланому и рак почки (Chavez, A.R., et al., Pharmacologic administration of interleukin-2, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2009, 1182:p.14-27). Исследования *in vitro* показали, что антитело по изобретению может специфически ослаблять иммуносупрессию PD-1, активировать Т-

клетки и индуцировать образование ИЛ-2 и обладают перспективами в отношении использования в генной терапии таких заболеваний, как опухоли и паразитарные инфекции.

Другой аспект по настоящему изобретению относится к способу *in vivo* или *in vitro* включающему: введение нуждающемуся в этом индивидууму эффективного количества антитела по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, конъюгата по настоящему изобретению, фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения или терапевтической комбинации по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения. Способ выбран из:

- способа блокирования связывания PD-1 с PD-L1,
- способа отрицательной регуляции активности или уровня PD-1,
- способа уменьшения иммуносупрессии PD-1 в организме или
- способа повышения экспрессии ИФН γ и/или ИЛ-2 в Т-лимфоцитах.

Настоящее изобретение также относится к антителу по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, конъюгату по настоящему изобретению, фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения или терапевтической комбинации по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения для применения в лечении и/или профилактике опухоли или анемии или диагностике опухоли или анемии, где, предпочтительно, опухоль выбрана из одной или более из меланомы, рака почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака толстого кишечника, рака прямой кишки, рака желудка, рака печени, рака легких, рака яичников, лейкоза, рака носоглотки и рака эндометрия;

предпочтительно, рак легких выбран из одного или более из немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких и плоскоклеточного рака легких;

предпочтительно, рак желудка является аденокарциномой желудка или аденокарциномой пищеводно-желудочного соединения;

предпочтительно, опухоль является солидной опухолью фенотипа MSI-H/dMMR; предпочтительно, опухоль выбрана из одной или более из следующих опухолей фенотипа MSI-H/dMMR:

рака толстого кишечника, рака прямой кишки, рака эндометрия, рака желудка, мезотелиомы, саркомы, карциномы коры надпочечников, злокачественной меланомы и эмбрионально-клеточной опухоли яичников.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения в случае антитела или конъюгата по настоящему изобретению опухоль является рецидивирующей, метастатической (например, метастазом в лимфоузле, метастазом в головном мозге и/или метастазом в кости) или рефрактерной опухолью.

Антитело по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения конъюгат по настоящему изобретению, фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения или терапевтическую комбинацию по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения используют для:

блокирования связывания PD-1 с PD-L1,
отрицательной регуляции активности или уровня PD-1,
уменьшения иммуносупрессии PD-1 в организме или
повышения экспрессии ИФН γ и/или ИЛ-2 в Т-лимфоцитах.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения и/или профилактики опухоли или анемии или способу диагностики опухоли или анемии, включающему: введение нуждающемуся в этом индивидууму эффективного количества антитела по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, конъюгата по настоящему изобретению, фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения или терапевтической комбинации по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, где, предпочтительно, опухоль выбрана из одной или более из меланомы, рака почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака толстого кишечника, рака прямой кишки, рака желудка, рака печени, рака легких, рака яичников, лейкоза, рака носоглотки и рака эндометрия;

предпочтительно, рак легких выбран из одного или более из немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких и плоскоклеточного рака легких;

предпочтительно, рак желудка является аденокарциномой желудка или аденокарциномой пищеводно-желудочного соединения;

предпочтительно, опухоль является солидной опухолью фенотипа MSI-H/dMMR; предпочтительно, опухоль выбрана из одной или более из следующих опухолей фенотипа MSI-H/dMMR:

рака толстого кишечника, рака прямой кишки, рака эндометрия, рака желудка, мезотелиомы, саркомы, карциномы коры надпочечников, злокачественной меланомы и эмбрионально-клеточной опухоли яичников.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения в случае способа опухоль является рецидивирующей, метастатической (например, метастазом в лимфоузле, метастазом в головном мозге и/или метастазом в кости) или рефрактерной опухолью.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения в случае способа введение осуществляют до или после хирургического лечения и/или до или после лучевой терапии.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения в способе однократная доза антитела против PD-1 составляет 0,1-100 мг, предпочтительно - 1-10 мг (например, 1 мг, 2 мг, 3 мг, 4 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг или 10 мг) на кг массы тела; альтернативно, однократная доза антитела против PD-1 составляет 10-1000 мг (например, приблизительно 100 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 200 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 450 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 600 мг, приблизительно 700 мг, приблизительно 800 мг, приблизительно 900 мг или

приблизительно 1000 мг), предпочтительно - 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг или 200 мг для каждого индивидуума;

предпочтительно, дозу вводят один раз в 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 10 дней, 1 неделю, 2 недели или 3 недели;

предпочтительно, путем введения является внутривенная капельная инфузия или внутривенная инъекция.

В некоторых вариантах осуществления введение антитела против PD-1 осуществляют циклами по 2 недели (14 дней) или 3 недели (21 день), и предпочтительно, антитело против PD-1 вводят внутривенно в первый день (D1) каждого цикла. Например, антитело против PD-1 вводят раз в две недели (q2w) или три недели (q3w).

В настоящем изобретении, если не указано иначе, научные и технические термины, используемые в настоящем описании, обладают значениями, общепринято понятными специалистам в этой области. Кроме того, лабораторные операции культивирования клеток, молекулярной генетики, химии нуклеиновых кислот и иммунологии, используемые в настоящем описании, являются рутинными способами, широко используемыми в соответствующих областях. В то же время, для лучшего понимания настоящего изобретения определения и объяснение соответствующих терминов приведены ниже.

В рамках изобретения ссылка на аминокислотную последовательность белка PD-1 (белка программируемой гибели клеток 1, NCBI GenBank: NP_005009.2) включает полноразмерный белок PD-1 или внеклеточный фрагмент PD-1ECD PD-1 или фрагмент, содержащий PD-1ECD; и он также включает слитые белки PD-1ECD, такие как фрагмент, слитый с Fc-фрагментом IgG мыши или человека (mFc или hFc). Однако специалистам в этой области будет понятно, что в аминокислотной последовательности белка PD-1 мутации или изменения (включая, в качестве неограничивающих примеров, замены, делеции и/или инсерции) могут возникать от природы, или их можно искусственно встраивать, не влияя на биологические функции. Таким образом, в настоящем изобретении термин "белок PD-1" должен включать все такие последовательности и природные или искусственные варианты. Более того, при описании фрагмента последовательности белка PD-1, он включает не только фрагмент последовательности, но также и соответствующие фрагменты последовательности в их природных или искусственных вариантах.

В рамках изобретения ссылка на аминокислотную последовательность белка PDL1 (NCBI Genebank ID: NP_054862.1) включает полноразмерный белок PDL1, или внеклеточный фрагмент PDL1ECD PDL1, или фрагмент, содержащий PDL1ECD; также включены слитые белки PDL1ECD, такие как фрагмент, слитый с Fc-фрагментом IgG мыши или человека (mFc или hFc). Однако специалистам в этой области будет понятно, что в аминокислотной последовательности белка PDL1 мутации или изменения (включая, в качестве неограничивающих примеров, замены, делеции и/или инсерции) могут возникать от природы, или их можно искусственно встраивать, не влияя на биологические

функции. Таким образом, в настоящем изобретении, термин "белок PDL1" должен включать все такие последовательности и их природные или искусственные варианты. Более того, при описании фрагмента последовательности белка PDL1, он включает не только фрагменты последовательности PDL1, но также и соответствующие фрагменты последовательности в их природных или искусственных вариантах.

В рамках изобретения термин "EC₅₀" относится к полумаксимальной эффективной концентрации.

В рамках изобретения термин "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, как правило, состоящей из двух пар полипептидных цепей (каждая пара состоит из одной "легкой" (L) цепи и одной "тяжелой" (H) цепи). Легкие цепи антитела классифицируют как легкие цепи κ и λ . Тяжелые цепи классифицируют как μ , δ , γ , α или ϵ . Изотипы антител определяют как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. В легких цепях и тяжелых цепях переменная область и константная область связаны "J"-областью из приблизительно 12 или более аминокислот, и тяжелая цепь также содержит "D"-область из приблизительно 3 или более аминокислот. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (V_H) и константной области тяжелой цепи (C_H). Константная область тяжелой цепи состоит из 3 доменов (C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (V_L) и константной области легкой цепи (C_L). Константная область легкой цепи состоит из одного домена C_L. Константная область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулинов с тканями или факторами организма-хозяина, включая связывание различных клеток иммунной системы (например, эффекторных клеток) с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Области V_H и V_L можно дополнительно разделять на высоковарибельные области (названные определяющими комплементарность областями (CDR)), между которыми распределены консервативные области, названные каркасными областями (FR). Каждый V_H и V_L состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенных от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области (V_H и V_L) каждой пары тяжелая цепь/легкая цепь образуют участок связывания антитела. Приписывание аминокислот к каждой области или домену соответствует определению по Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1987 and 1991)), Chothia & Lesk, (1987) J. Mol. Biol., 196:901-917 или Chothia et al. (1989) Nature, 342:878-883. Термин "антитело" не ограничен конкретным способом получения антитела. Например, антитело, в частности, включает рекомбинантное антитело, моноклональное антитело и поликлональное антитело. Антитело может представлять собой антитела разных изотипов, таких как IgG (например, подтип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM.

В рамках изобретения термины "mAb" и "моноклональное антитело" относятся к антителу или его фрагменту, полученному из группы высокомолекулярных антител, т.е. из группы молекул антител, являющихся идентичными, за исключением природных мутаций, которые могут возникать спонтанно. Моноклональное антитело является

высокоспецифическим к одному эпитопу на антигене. Относительно моноклонального антитела, поликлональное антитело, как правило, включает по меньшей мере два или более разных антител, как правило, распознающих разные эпитопы на антигене. Моноклональные антитела, как правило, можно получать гибридным способом, впервые описанным Kohler et al. (Kohler et al., *Nature*, 256:495, 1975), а также с использованием способа рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567).

В рамках изобретения термин "гуманизированное антитело" относится к антителу или фрагменту антитела, полученным, когда все или часть областей CDR иммуноглобулина человека (акцепторного антитела) заменяют областями CDR не принадлежащего человеку антитела (донорного антитела), где донорное антитело может являться непринадлежащим человеку антителом (например, антителом мыши, крысы или кролика), имеющим ожидаемую специфичность, аффинность или реактивность. Кроме того, некоторые аминокислотные остатки в каркасных областях (FR) рецепторного антитела также можно заменять аминокислотными остатками соответствующих непринадлежащих человеку антител или аминокислотными остатками других антител для дальнейшего улучшения или оптимизации характеристик антитела. Подробности о гуманизированных антителах см., например, в Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992); и Clark, *Immunol. Today* 21: 397-402 (2000).

В рамках изобретения термин "выделенный" относится к получению искусственными средствами из природного состояния. Если некоторое "выделенное" вещество или компонент встречается в природе, возможно возникновение изменения в природном окружении, или его выделяют из природного окружения, или и то, и другое. Например, если некоторый невыделенный полинуклеотид или полипептид в природе существует в некотором живом животном, такой полинуклеотид или полипептид с более высокой чистотой, выделенный из такого природного состояния, называют выделенным полинуклеотидом или полипептидом. Термин "выделенный" не исключают существования искусственных или синтетических веществ или других примесей, не влияющих на активность вещества.

В рамках изобретения термин "вектор" относится к носителю нуклеиновой кислоты, в который встраивают полинуклеотид. Если вектор делает возможной экспрессию белка, кодируемого встроенным полинуклеотидом, вектор называют экспрессирующим вектором. Вектор можно встраивать в клетку-хозяина посредством трансформации, трансдукции или трансфекции таким образом, что генетические элементы, переносимые вектором, можно экспрессировать в клетке-хозяине. Векторы хорошо известны специалистам в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров: плазмиды; фагмиды; космиды; искусственные хромосомы, такие как искусственная дрожжевая хромосома (YAC), искусственная бактериальная хромосома (BAC) или полученная из P1 искусственная хромосома (PAC); фагов, таких как фаги лямбда или фаги M13; и вирусы животных. Вирусы животных, которые можно

использовать в качестве векторов, включают, в качестве неограничивающих примеров, ретровирусы (включая лентивирусы), аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса (такие как вирус простого герпеса), поксвирусы, бакуловирусы, папилломавирусы и паповавирусы (такие как SV40). Вектор может содержать различные элементы, контролирующие экспрессию, включая, в качестве неограничивающих примеров, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, селективные элементы и репортерные гены. Кроме того, вектор может дополнительно содержать участок начала репликации.

В рамках изобретения термин "клетка-хозяин" относится к клеткам, в которые можно встраивать векторы, включая, в качестве неограничивающих примеров, прокариотические клетки, такие как *E. coli* или *Bacillus subtilis*, клетки грибов, такие как дрожжевые клетки или *Aspergillus*, клетки насекомых, такие как клетки дрозофилы S2 или Sf9, или клетки животных, такие как фибробласты, клетки CHO, клетки COS, клетки NSO, клетки HeLa, клетки ВНК, клетки НЕК 293 или клетки человека.

В рамках изобретения термин "специфическое связывание" относится к реакции неслучайного связывания между двумя молекулами, такой как реакция между антителом и его антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления антитело, специфически связывающееся с антигеном (или антитело, являющееся специфическим к антигену), относится к антителу, связывающемуся с антигеном с аффинностью (K_D) менее приблизительно 10^{-5} М, например, менее приблизительно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или менее.

В рамках изобретения термин " K_D " относится к равновесной константе диссоциации для специфического взаимодействия антитело-антиген, используемого для описания аффинности связывания между антителом и антигеном. Более низкая равновесная константа диссоциации свидетельствует о более сильном связывании антитело-антиген и более высокой аффинности между антителом и антигеном. Как правило, антитела связываются с антигенами (например, белком PD-1) с равновесной константой диссоциации (K_D) менее приблизительно 10^{-5} М, например, менее приблизительно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или менее. K_D можно определять способами, известными специалистам в этой области, например, с использованием системы Fortebio.

В рамках изобретения термины "моноклональное антитело" и "mAb" имеют одинаковое значение, и их можно использовать взаимозаменяемо; термины "поликлональное антитело" и "pAb" имеют одинаковое значение, и их можно использовать взаимозаменяемо; термины "полипептид" и "белок" имеют одинаковое значение, и их можно использовать взаимозаменяемо. Кроме того, в настоящем описании аминокислоты, как правило, представлены однобуквенными и трехбуквенными сокращениями, известными в этой области. Например, аланин можно представлять как А или Ala.

В рамках изобретения термин "фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент" относится к носителю и/или эксципиенту, являющемуся фармакологически и/или физиологически совместимым с индивидуумом и активным ингредиентом. Такие носители и/или эксципиенты хорошо известны в этой области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, изданную Gennaro AR, 19th ed., Pennsylvania, Mack Publishing Company, 1995), включая, в качестве неограничивающих примеров: регуляторы pH, поверхностно-активные вещества, адъюванты и усилители ионной силы. Например, регуляторы pH включают, в качестве неограничивающих примеров, фосфатный буфер; поверхностно-активные вещества включают, в качестве неограничивающих примеров, катионные, анионные или неионные поверхностно-активные средства, такие как Tween-80; усилители ионной силы включают, в качестве неограничивающих примеров, хлорид натрия.

В рамках изобретения термин "адъювант" относится к неспецифическому иммунному усилителю, который может усиливать иммунный ответ организма на антигены или изменять тип иммунного ответа при введении в организм вместе с антигенами или заранее. Существуют различные адъюванты, включая, в качестве неограничивающих примеров, алюминиевые адъюванты (например, гидроксид алюминия), адъювант Фрейнда (например, полный адъювант Фрейнда и неполный адъювант Фрейнда), *Corynebacterium parvum*, липополисахарид, цитокин и т.д. Адъювант Фрейнда является наиболее общеупотребительным адъювантом в экспериментах на животных. Адъювант на основе гидроксида алюминия чаще используют в клинических испытаниях.

В рамках изобретения термин "эффективное количество" относится к количеству, достаточному для достижения или по меньшей мере частичного достижения желаемых эффектов. Например, профилактически эффективное количество против заболевания (например, RA) является количеством, достаточным для профилактики, задержки или замедления дебюта заболевания (например, RA); термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, достаточному для излечения или по меньшей мере частичной задержки заболевания и его осложнений у пациентов, страдающих заболеванием. Разумеется, специалисты в этой области могут определять такое эффективное количество. Например, количество, эффективное для терапевтической цели, будет зависеть от тяжести заболевания, подлежащего лечению, общего состояния иммунной системы пациента, общего состояния пациента, например, возраста, массы тела и пола, пути введения, другого сопутствующего лечения и т.д.

В рамках изобретения термин "полностью устраненный" относится к отсутствию сигнала связывания или крайне слабому сигналу связывания, определяемому с помощью существующих устройств (например, системы Fortebio Octet). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения отсутствие сигнала связывания или крайне слабый сигнал связывания относятся к сигналу связывания (т.е. ответу) ниже 0,1 нм.

"Рецидивирующее" злокачественное новообразование является злокачественным новообразованием, регенерирующим в исходном очаге или отдаленном очаге после ответа на предшествующее лечение (например, хирургическое вмешательство). "Местнорецидивирующее" злокачественное новообразование является злокачественным новообразованием, возникающим после лечения в том же очаге, что и подвергнутое ранее злокачественное новообразование.

Термин "метастазирующее" злокачественное новообразование относится к злокачественному новообразованию, распространяющемуся из одной части организма (например, легких) в другую.

Благоприятные эффекты

Настоящее изобретение позволяет достигать одного или более из следующих технических эффектов (1)-(9):

(1) Антитела по настоящему изобретению, в частности, 14C12H1L1(hG1TM) и 14C12H1L1(hG1WT), могут эффективно блокировать иммуносупрессию иммунных клеток, индуцируемую связыванием PD-1/PDL1, и индуцировать секрецию ИФН γ и ИЛ-2 в мононуклеарных клетках периферической крови человека.

(2) Настоящее изобретение позволяет полностью устранять связывающую активность антител, в частности, 14C12H1L1(hG1TM), в отношении Fc-рецепторов, т.е. Fc γ RI, Fc γ RIIa_H131, Fc γ RIIa_V158 и/или Fc γ RIIa_F158, таким образом, устраняя активность ADCC или активность ADCP.

(3) Настоящее изобретение позволяет полностью устранять связывающую активность антител, в частности, 14C12H1L1(hG1TM), в отношении комплемента C1q, таким образом, устраняя активность CDC.

(4) Настоящее изобретение позволяет значимо снижать связывающую активность антител, например, 14C12H1L1 (hG1DM), в отношении Fc-рецепторов, т.е. Fc γ RI, Fc γ RIIa_H131, Fc γ RIIa_R131 и/или Fc γ RIIa_V158, и полностью устранять связывание с Fc γ RIIa_F158 и/или Fc γ RIIb, таким образом, значимо снижая активность ADCC.

(5) Настоящее изобретение позволяет полностью устранять связывающую активность антител, в частности, 14C12H1L1(hG1DM), в отношении комплемента C1q, таким образом, устраняя активность CDC.

(6) Моноклональные антитела по настоящему изобретению, в частности, 14C12H1L1(hG1TM), 14C12H1L1(hG1DM) и 14C12H1L1(hG1WT), могут хорошо и специфически связываться с PD-1 и могут эффективно блокировать связывание PD-1 с PDL1, таким образом, специфически уменьшая иммуносупрессию PD-1 в организме и активируя Т-клетки. Среди них, антитело против PD-1 14C12H1L1(hG1TM) имеет значимо более высокий индуцирующий эффект, чем у контрольного антитела против PD-1 ниволумаба и контрольного антитела против PDL1 5C10H2L2-IgG1mt, в отношении секреции ИФН γ и ИЛ-2, что демонстрирует потенциал для использования в получении лекарственного средства для профилактики и лечения опухолей.

(7) Антитела по настоящему изобретению обладают способностью эффективно предотвращать и лечить описанные выше опухоли.

(8) Антитела по настоящему изобретению обладают более низкими токсическими и побочными эффектами.

(9) Антитела против PD-1 по настоящему изобретения или антитела против PD-1 в терапевтической комбинации по настоящему изобретения обладают синергическим эффектом с химиотерапевтическим средством.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM) к FcγRI. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,12 нМ, соответственно.

Фиг. 2: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG4) к FcγRI. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,12 нМ, соответственно.

Фиг. 3: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1WT) к FcγRI. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,12 нМ, соответственно.

Фиг. 4: Анализ константы аффинности о 14C12H1L1(hG1TM) к FcγRI. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,12 нМ, соответственно.

Фиг. 5: Анализ константы аффинности 5C10H2L2-IgG1mt к FcγRI. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,12 нМ, соответственно.

Фиг. 6: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM) к FcγRIIIa_V158. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

Фиг. 7: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG4) к FcγRIIIa_V158. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

Фиг. 8: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1WT) к FcγRIIIa_V158. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

Фиг. 9: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1TM) к FcγRIIIa_V158. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

Фиг. 10: Анализ константы аффинности 5C10H2L2-IgG1mt к FcγRIIIa_V158. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

Фиг. 11: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM) у FcγRIIIa_F158. Концентрации антигена для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

Фиг. 12: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG4) к FcγRIIIa_F158. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

Фиг. 13: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1WT) к FcγRIIIa_F158. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

Фиг. 14: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1TM) к FcγRIIIa_F158. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

Фиг. 15: Анализ константы аффинности 5C10H2L2-IgG1mt к FcγRIIIa_F158. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

Фиг. 16: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM) к FcγRIIIa_H131. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

Фиг. 17: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG4) к FcγRIIIa_H131. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

Фиг. 18: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1WT) к FcγRIIIa_H131. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

Фиг. 19: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1TM) к FcγRIIIa_H131. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

Фиг. 20: Анализ константы аффинности 5C10H2L2-IgG1mt к FcγRIIIa_H131. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

Фиг. 21: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM) к FcγRIIIa_R131.. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

Фиг. 22: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG4) к FcγRIIIa_R131. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

Фиг. 23: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1WT) FcγRIIIa_R131. концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

Фиг. 24: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1TM) к FcγRIIa_R131. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

Фиг. 25: Анализ константы аффинности 5C10H2L2-IgG1mt к FcγRIIa_R131. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

Фиг. 26: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM) к FcγRIIb. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

Фиг. 27: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG4) у FcγRIIb. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

Фиг. 28: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1WT) к FcγRIIb. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

Фиг. 29: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1TM) к FcγRIIb. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

Фиг. 30: Анализ константы аффинности 5C10H2L2-IgG1mt к FcγRIIb. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

Фиг. 31: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM) к C1q. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ и 1,25 нМ, соответственно.

Фиг. 32: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG4) к C1q. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ и 1,25 нМ, соответственно.

Фиг. 33: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1WT) к C1q. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ и 1,25 нМ, соответственно.

Фиг. 34: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1TM) к C1q. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ и 1,25 нМ, соответственно.

Фиг. 35: Анализ константы аффинности 5C10H2L2-IgG1m к C1q. Концентрации антигена для пар кривых сверху вниз составляют 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ и 1,25 нМ, соответственно.

Фиг. 36: Анализ секреции ИФНγ посредством добавления 14C12H1L1 (hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) к реакции смешанной культуры лимфоцитов.

Фиг. 37: Анализ секреции ИЛ-2 посредством добавления 14C12H1L1 (hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) к реакции смешанной культуры лимфоцитов.

Фиг. 38: Анализ эффекта ADCP 14C12H1L1(hG1WT), ниволумаба и 14C12H1L1(hG1TM).

Фиг. 39: Анализ цитолитического эффекта 14C12H1L1(hG1TM) + анлотиниб в отношении клеток немелкоклеточного рака легких человека.

Фиг. 40: Ингибированная пролиферация клеток колоректального рака мыши MC38 под действием 14C12H1L1(hG1TM).

Фиг. 41: Эффективно усиленный иммунный ответ иммунных клеток на клетки рака желудка человека КАТО III под действием 14C12H1L1(hG1TM).

Фиг. 42: Эффективно усиленный иммунный ответ иммунных клеток на клетки рака носоглотки CNE-2Z под действием 14C12H1L1(hG1TM).

Фиг. 43: Эффективно усиленный иммунный ответ иммунных клеток на клетки мезотелиомы NCI-H2452 под действием 14C12H1L1(hG1TM).

Фиг. 44: Эффективно усиленный иммунный ответ иммунных клеток на клетки немелкоклеточного рака легких человека NCI-H446 под действием 14C12H1L1(hG1TM).

Фиг. 45: Эффективно усиленный иммунный ответ иммунных клеток на клетки рака носоглотки CNE-2Z под действием 14C12H1L1(hG1TM) в комбинации с гидрохлоридом анлотиниба.

Фиг. 46: Значимо усиленный иммунный ответ иммунных клеток на клетки опухоли MSI-H/dMMR SW48 под действием 14C12H1L1(hG1TM) в комбинации с анлотинибом.

Фиг. 47: Значимо усиленный иммунный ответ иммунных клеток на клетки колоректального рака человека SW837 фенотипа не-MSI-H/dMMR (т.е. MSS) под действием 14C12H1L1(hG1TM).

Фиг. 48: Значимо усиленный иммунный ответ иммунных клеток на клетки колоректального рака человека SW837 фенотипа не-MSI-H/dMMR (т.е. MSS) под действием 14C12H1L1(hG1TM) в комбинации с анлотинибом.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Варианты осуществления настоящего изобретения будут подробно описаны ниже со ссылкой на примеры. Специалистам в этой области будет понятно, что следующие примеры используют исключительно для иллюстрирования настоящего изобретения, и их не следует истолковывать как ограничение объема настоящего изобретения. В случаях, когда способы или условия не определены, примеры осуществляли в соответствии со способами или условиями, описанными в литературе в этой области (например, см. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, написанный J. Sambrook et al. и переведенный Huang Peitang et al., Third Edition, Science Press) или в соответствии с инструкцией к продукту. Используемые реагенты или устройства являются коммерчески доступными общепринятыми продуктами, если их производители не определены.

В следующих экспериментах по настоящему изобретению:

Мышей BALB/c приобретали в Guangdong Medical Laboratory Animal Center.

Антитело против PDL1 5C10H2L2-IgG1mt получали способами, описанными в публикации PCT № WO2017148424A1.

Антитело против PD-1 ниволумаб (торговое название: Opdivo) приобретали в Bristol-Myers Squibb.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека выделяли и подготавливали в AkesoBiopharma, Inc. с информированным согласием от донора.

Raji-PDL1 является клеткой, экспрессирующей PD-L1 человека и сконструированной AkesoBiopharma на основе В-клеток человека Raji посредством трансфекции.

Ficoll-PaqueTM PLUS (или Ficoll-Paque PLUS) приобретали в GE Healthcare.

Набор для ELISA ИЛ-2 человека приобретали в Dakewe Biotech Co., Ltd.

Среду RPMI 1640, среду DMEM, трипсин-ЭДТА (0,25%), феноловый красный и бластидин приобретали в Gibco.

Энтеротоксин В Staphylococcus aureus (SEB) приобретали в Dianotech.

FBS приобретали в Excell bio.

Митомицин С (MMC) приобретали в Stressmarq.

Последовательность изотипического контроля, IgG человека против лизоцима куриного яйца (антитело против HEL или IgG человека, сокращенно обозначаемое как hIgG) получают из последовательности варибельной области последовательности Fab F10.6.6 в исследовании, описанном Acierno et al., названном "Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies" (Acierno et al., J Mol Biol., 2007; 374(1):130-146).

Анлотиниб, используемый в примерах, является гидрохлоридом анлотиниба под торговым названием Fukewei® и непатентованным наименованием гидрохлорид анлотиниба, и его приобретали в CTTQ Pharma.

Пример получения 1: Дизайн последовательности антитела против PD-1 14C12 и соответствующего гуманизированного антитела 14C12H1L1(hG1WT)

Аминокислотные последовательности и кодирующие нуклеотидные последовательности тяжелых и легких цепей антитела против PD-1 14C12 и соответствующего гуманизированного антитела 14C12H1L1(hG1WT) идентичны таковым 14C12 и 14C12H1L1 в китайской патентной публикации № CN106967172A (или № CN106977602A), соответственно.

(1) Последовательности варибельных областей тяжелой и легкой цепи 14C12

Нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи 14C12: (354 п.н.)

GAGGTCAAACCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGGCTGGTGAAGCCCCGGCGGGTCA
CTGAAACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCATGG
GTGAGGCAGACCCCTGAGAAGCGCCTGGAATGGGTCTGCTACTATCAGCGGAGGCGG
GCGATACACCTACTATCCTGACTCTGTCAAAGGGAGATTCACAATTAGTCGGGATAA
CGCCAGAAATACTCTGTATCTGCAGATGTCTAGTCTGCGGTCCGAGGATACAGCTCT
GTACTATTGTGCAAACCGGTACGGCGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGACAGGGCA
CCCTGGTGACAGTCTCTGCC (SEQ ID NO: 1)

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 14C12: (118 аминокислот)

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATISGG
GRYTYYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDALYYCANRYGEAWFAYWGQG
TLVTVSA (SEQ ID NO: 2)

Нуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область легкой цепи 14C12: (321 п.н.)

GACATTAAGATGACACAGTCCCCTTCCTCAATGTACGCTAGCCTGGGCGAGC
GAGTGACCTTCACATGCAAAGCATCCCAGGACATCAACACATACCTGTCTTGGTTTC
AGCAGAAGCCAGGCAAAAGCCCCAAGACCCTGATCTACCGGGCCAATAGACTGGTG
GACGGGGTCCCCAGCAGATTCTCCGGATCTGGCAGTGGGCAGGATTACTCCCTGACC
ATCAGCTCCCTGGAGTATGAAGACATGGGCATCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAG
TTCCCTCTGACCTTTGGAGCAGGCACAAACTGGAAGTGAAG (SEQ ID NO: 3)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 14C12: (107 аминокислот)

DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV
DGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID
NO: 4)

(2) Последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей и тяжелой и легкой цепи гуманизированного моноклонального антитела 14C12H1L1(hG1WT)

Нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 14C12H1L1(hG1WT): (354 п.н.)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTCA
CTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGG
GTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAGGCGG
GAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATA
ACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCA
CTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGA
ACCCTGGTGACAGTCTCTAGT (SEQ ID NO: 5)

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 14C12H1L1(hG1WT): (118 аминокислот)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG
GGRYTYYPDSVKGRFTISRDNNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ
GTLVTVSS (SEQ ID NO: 6)

Нуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область легкой цепи 14C12H1L1(hG1WT): (321 п.н.)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACA
GGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTC
AGCAGAAGCCAGGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTG
TCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGAC

CATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAACCTGGAGCTGAAG (SEQ ID NO: 7)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 14C12H1L1(hG1WT): (107 аминокислот)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 8)

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 14C12H1L1(hG1WT): (1344 п.н.)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGGTGCGACAGGCACCAAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCTACTATCTCAGGAGGCGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTAGTGCCAGCACCAAAGGACCTAGCGTGTTTCCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCACCGAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCCGTACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGTACAGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAACCACAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACACACCTGTCCCCCTGTCTGCTCCCGAACTCCTCGGAGGCCCTAGCGTCTTCCTCTTTCCTCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTGTCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAACCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGACGAACTCACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCCAGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTACAAGACACCCCCTCCTGTCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAAGCCCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA (SEQ ID NO: 9)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 14C12H1L1(hG1WT): (448 аминокислот)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK

TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 10)

Нуклеотидная последовательность легкой цепи 14C12H1L1(hG1WT): (642 п.н.)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACA
GGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTC
AGCAGAAGCCAGGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTG
TCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGAC
CATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGA
GTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAACCTGGAGCTGAAGCGAACTGTGGCCG
CTCCCTCCGTCTTCATTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCA
GCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTAGAGAGGCAAAAGTGCAGTGGAAG
GTCGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTC
AAAAGATAGCACCTATTCCCTGTCTAGTACACTGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGA
GAAGCACAAAGTGTATGCATGCGAAGTGACACATCAGGGACTGTCAAGCCCCGTGA
CTAAGTCTTTTAACCGGGGCGAATGT (SEQ ID NO: 11)

Аминокислотная последовательность легкой цепи 14C12H1L1(hG1WT): (214 аминокислот)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV
SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:12)

Пример получения 2: Дизайн последовательности гуманизированного антитела 14C12H1L1(hG4)

Вариабельные области тяжелой и легкой цепи идентичны таковым в 14C12H1L1(hG1WT). С-область цепи гамма-4 Ig (регистрационный номер: P01861.1) использовали в качестве константной области тяжелой цепи и С-область цепи каппа Ig (регистрационный номер: P01834) использовали в качестве константной области легкой цепи, таким образом, получая антитело 14C12H1L1(hG4). Последовательность 14C12H1L1(hG4) являлась следующей:

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 14C12H1L1(hG4): (1335 п.н.)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCCGGCGGGTCA
CTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGG
GTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAGGCGG
GAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATA
ACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCA
CTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCGAGGGA
ACCCTGGTGACAGTCTCTAGTGCCAGCACCAAAGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCG
CCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA
CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT

GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT
 GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAATCACA
 AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGC
 CCACCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCA
 AAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTG
 GACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTG
 TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAG
 TGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC
 AAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGAT
 GACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACA
 TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT
 CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAG
 AGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
 CAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA (SEQ ID NO: 13)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 14C12H1L1(hG4): (445 аминокислот)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG
 GGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP
 EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
 LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRL
 TVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 14)

Нуклеотидная последовательность легкой цепи 14C12H1L1(hG4) идентична SEQ ID NO: 11.

Аминокислотная последовательность легкой цепи 14C12H1L1(hG4) идентична SEQ ID NO: 12.

Пример получения 3: Дизайн последовательности гуманизированного антитела 14C12H1L1(hG1TM)

На основе 14C12H1L1(hG1WT), полученного в примере получения 1, получали гуманизированное мутантное 14C12H1L1(hG1TM) посредством встраивания точечной мутации лейцина в аланин в положении 234 (L234A), точечной мутации лейцина в аланин в положении 235 (L235A) и точечной мутации глицина в аланин в положении 237 (G237A) в шарнирной области тяжелой цепи по системе нумерации EU.

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 14C12H1L1(hG1TM): (1344 п.н.)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTCA
 CTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTGCGCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGG
 GTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAGGCGG

GAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATA
 ACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCA
 CTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCGAGGA
 ACCCTGGTGACAGTCTCTAGTGCCAGCACCAAAGGGCCCAGCGTGTTTCCTCTCGCC
 CCCTCCTCCAAAAGCACCAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGA
 CTA CTTCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGT
 CCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGT
 CACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAACCACA
 AGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCCAAATCCTGCGACAAGACA
 CACACCTGTCCCCCCTGTCTGCTCCCGAAGCTGCTGGAGCCCCTAGCGTCTTCCTCT
 TTCCTCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTG
 TCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATG
 GCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACA ACTCCACC
 TACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGA
 GTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATGAGAAGACCATCA
 GCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACTGCCTCCCTCCAGG
 GACGA ACTCACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCC
 AGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTACAAGAC
 CACCCCTCCTGTCTCTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG
 GACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAAGC
 CCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA (SEQ ID
 NO: 15)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 14C12H1L1(hG1TM): (448
 аминокислот)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG
 GGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 16)

Нуклеотидная последовательность легкой цепи 14C12H1L1(hG1TM) идентична SEQ
 ID NO: 11.

Аминокислотная последовательность легкой цепи 14C12H1L1(hG1TM) идентична
 SEQ ID NO: 12.

Пример получения 4: Дизайн последовательности гуманизированного антитела
 14C12H1L1(hG1DM)

На основе 14C12H1L1(hG1WT) получали гуманизированное мутантное антитело
 14C12H1L1(hG1DM) посредством встраивания точечной мутации лейцина в аланин в

положении 234 (L234A) и точечной мутации лейцина в аланин в положении 235 (L235A) в шарнирной области тяжелой цепи.

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 14C12H1L1(hG1DM): (1344 п.н.)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCCGGCGGGTCA
CTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGG
GTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAGGCGG
GAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATA
ACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCA
CTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCGAGGGA
ACCCTGGTGACAGTCTCTAGTGCTAGCACCAAAGGGCCCAGCGTGTTTCCTCTCGCC
CCCTCCTCCAAAAGCACCAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGA
CTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGT
CCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGT
CACAGTGCCCGAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAACCACA
AGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACA
CACACCTGTCCCCCTGTCTGCTCCCGAAGCTGCTGGAGGCCCTAGCGTCTTCCTCT
TTCCTCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTG
TCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATG
GCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACC
TACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGA
GTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATGAGAAGACCATCA
GCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGG
GACGAACCTACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCC
AGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTACAAGAC
CACCCCTCCTGTCTCTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG
GACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAAGC
CCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA (SEQ ID
NO: 17)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 14C12H1L1(hG1DM): (448 аминокислот)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG
GGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 18)

Нуклеотидная последовательность легкой цепи 14C12H1L1(hG1DM) идентична SEQ ID NO: 11.

Аминокислотная последовательность легкой цепи 14C12H1L1(hG1DM) идентична SEQ ID NO: 12.

Экспериментальный пример 1: Анализ аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) к Fc-рецептору FcγRI

Fc-рецептор FcγRI, также известный как CD64, может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и участвует в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Связывающая способность терапевтического моноклонального антитела в отношении Fc-рецепторов будет влиять на безопасность и эффективность антитела. В этом эксперименте константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) к FcγRI измеряли с использованием системы Fortebio Octet для оценки активности ADCC антител.

Способ определения константы аффинности антител к FcγRI с помощью системы Fortebio Octet в кратком изложении описан следующим образом: буфером для разведения образцов являлся раствор 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA в PBS, pH 7,4. Раствор 1 мкг/мл FcγRI (от Sinobio) добавляли к сенсору HIS1K для иммобилизации FcγRI на поверхности сенсора в течение 50 сек. Константы ассоциации и диссоциации антител и FcγRI определяли в буфере с концентрациями антител 3,12-50 нМ (серийные двукратные разведения). Сенсор с иммобилизованным антигеном уравнивали буфером в течение 60 сек, а затем связывание иммобилизованного FcγRI на сенсоре с антителами определяли в течение 120 сек; диссоциацию FcγRI от антител определяли в течение 120 сек. Температура составляла 30°C, и частота составляла 0,3 Гц. Данные аппроксимировали и анализировали с использованием модели 1:1 для получения констант аффинности антител к FcγRI.

Результаты анализа константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) и контрольного антитела 5C10H2L2-IgG1mt к FcγRI приведены в таблице 1 и на фиг. 1-5.

Таблица 1: Кинетика связывания 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) и контрольного антитела 5C10H2L2-IgG1mt с FcγRI

Антитело	K _D (M)	k _{on} (1/Mc)	SE (k _{on})	k _{dis} (1/c)	SE(k _{dis})	Rmax (нм)
14C12H1L1(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
14C12H1L1(hG4)	5,80E-09	6,37E+05	2,21E+04	3,69E-03	1,05E-04	0,45-0,54
14C12H1L1(hG1WT)	2,52E-09	6,94E+05	2,19E+04	1,75E-03	9,14E-05	0,50-0,55
14C12H1L1(hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5C10H2L2-IgG1mt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A означает, что антитело не имело связывания или имело крайне слабый сигнал связывания с антигеном, и, таким образом, результаты не анализировали и не получали соответствующих данных.

Результаты свидетельствовали о том, что 14C12H1L1(hG4) и 14C12H1L1(hG1WT) связывались с FcγRI с константами аффинности 5,80E-09 М и 2,52E-09 М, соответственно; 14C12H1L1(hG1TM) и 5C10H2L2-IgG1mt не имели связывания или имели крайне слабый сигнал связывания с FcγRI, и, таким образом, результаты не анализировали и не получали соответствующих данных.

Результаты позволяли предполагать, что связывающие активности 14C12H1L1(hG1DM) и 14C12H1L1(hG1TM) в отношении FcγRI эффективно устранены по сравнению с 14C12H1L1(hG4) и 14C12H1L1(hG1WT).

Экспериментальный пример 2: Анализ аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) к Fc-рецептору FcγRIIIa и его подтипам

(1) Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) к FcγRIIIa_V158

Fc-рецептор FcγRIIIa_V158 (также известный как CD16a_V158), может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и опосредует эффекты ADCC. В этом эксперименте константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) к FcγRIIIa_V158 измеряли с использованием системы ForteBio Octet для оценки активности ADCC антител.

Способ определения константы аффинности антител и контрольного антитела 5C10H2L2-IgG1mt к FcγRIIIa_V158 с помощью системы ForteBio Octet в кратком изложении описан следующим образом: буфером для разведения образцов являлся раствор 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA в PBS, pH 7,4. 5 мкг/мл FcγRIIIa_V158 иммобилизовали на сенсоре HIS1K в течение 120 сек. Сенсор уравнивали буфером в течение 60 сек и определяли связывание иммобилизованного FcγRIIIa_V158 на сенсоре с антителами в концентрациях 31,25-500 нМ (серийные двукратные разведения) в течение 60 сек. Антитело диссоциировало в буфере в течение 60 сек. Сенсор регенерировали 4 раза в 10 мМ глицине, pH 1,5, по 5 сек. Температура составляла 30°C, и частота составляла 0,3 Гц. Данные анализировали с помощью модели аппроксимации 1:1 для получения констант аффинности.

Результаты анализа константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) и контрольного антитела 5C10H2L2-IgG1mt к FcγRIIIa_V158 приведены в таблице 2 и на фиг. 6-10.

Таблица 2: Кинетика связывания 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) и контрольного антитела 5C10H2L2-IgG1mt с FcγRIIIa_V158

Антитело	K _D (М)	k _{on} (1/Мс)	SE (k _{on})	k _{dis} (1/с)	SE (k _{dis})	Rmax (нМ)
14C12H1L1(hG1DM)	6,12E-07	1,35E+05	3,74E+04	8,24E-02	8,34E-03	0,33-0,41
14C12H1L1(hG4)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

14C12H1L1(hG1WT)	6,54E-08	2,61E+05	2,10E+04	1,71E-02	6,47E-04	0,80-1,17
14C12H1L1(hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5C10H2L2-IgG1mt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A означает, что антитело не имело связывания или имело крайне слабый сигнал связывания с антигеном, и таким образом результаты не анализировали и не получали соответствующих данных.

Результаты свидетельствовали о том, что 14C12H1L1(hG1DM) и 14C12H1L1(hG1WT) связывались с FcγRIIIa_V158 с константами аффинности 6,21E-07M и 6,54E-08M, соответственно; 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1TM) и 5C10H2L2-IgG1mt не имели связывания или имели крайне слабый сигнал связывания с FcγRIIIa_V158, и, таким образом, результаты не анализировали.

Результаты позволяли предполагать, что связывающие активности 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1TM) и контрольного антитела 5C10H2L2-IgG1mt в отношении FcγR IIIa_V158 эффективно устранены по сравнению с 14C12H1L1(hG1DM) и 14C12H1L1(hG1WT).

(2) Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) к FcγRIIIa_F158

Fc-рецептор FcγRIIIa_F158 (также известный как CD16a_F158) может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и опосредовать эффекты ADCC. В этом эксперименте константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT), 14C12H1L1(hG1TM) и контрольного антитела к FcγRIIIa_F158 измеряли с использованием системы Fortebio Octet для оценки активности ADCC антител.

Способ определения константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) к FcγRIIIa_F158 с помощью системы Fortebio Octet в кратком изложении описан следующим образом: буфером для разведения образцов являлся раствор 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA в PBS, pH 7,4. 5 мкг/мл FcγRIIIa_F158 иммобилизовали на сенсоре HIS1K в течение 120 сек. Сенсор уравнивали буфером в течение 60 сек и определяли связывание иммобилизованного FcγRIIIa_F158 на сенсоре с антителами в концентрациях 31,25-500 нМ (серийные двукратные разведения) в течение 60 сек. Антитело диссоциировало в буфере в течение 60 сек. Сенсор регенерировали 4 раза в 10 мМ глицине, pH 1,5, по 5 сек. Температура составляла 30°C, и частота составляла 0,3 Гц. Данные анализировали с помощью модели аппроксимации 1:1 для получения констант аффинности.

Результаты анализа константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) и контрольного антитела 5C10H2L2-IgG1mt к FcγRIIIa_F158 приведены в таблице 3 и на фиг. 11-15.

Таблица 3: Кинетика связывания антител 14C12H1L1 и их изотипов с FcγRIIIa_F158

Антитело	K _D (M)	k _{on} (1/Mc)	SE (k _{on})	k _{dis} (1/c)	SE (k _{dis})	Rmax (нМ)
----------	--------------------	------------------------	-----------------------	------------------------	------------------------	-----------

14C12H1L1(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
14C12H1L1(hG4)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
14C12H1L1(hG1WT)	1,02E-07	2,52E+05	2,93E+04	2,56E-02	1,12E-03	0,34-0,57
14C12H1L1(hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5C10H2L2-IgG1mt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A означает, что антитело не имело связывания или имело крайне слабый сигнал связывания с антигеном, и таким образом результаты не анализировали и не получали соответствующих данных.

Результаты свидетельствовали о том, что 14C12H1L1(hG1WT) связывалось с FcγRIIIa_F158 с константой аффинности 1,02E-07M; 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1TM) и 5C10H2L2-IgG1mt не имели связывания или имели крайне слабый сигнал связывания с FcγRIIIa_F158, и, таким образом, результаты не анализировали и не получали соответствующих данных.

Результаты позволяли предполагать, что связывающие активности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4) и 14C12H1L1(hG1TM) в отношении FcγRIIIa_F158 эффективно устранены по сравнению с 14C12H1L1(hG1WT).

Экспериментальный пример 3: Анализ аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) к Fc-рецептору FcγRIIa и его подтипам

(1) Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) к FcγRIIa_H131

Fc-рецептор FcγRIIa_H131, также известный как CD32a_H131, может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и участвует в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Связывающая способность терапевтического моноклонального антитела в отношении Fc-рецепторы будет влиять на безопасность и эффективность антитела. В этом эксперименте константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) в отношении FcγRIIa_H131 измеряли с использованием системы ForteBio Octet для оценки связывающей способности антител в отношении Fc-рецептора.

Способ определения константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) к FcγRIIa_H131 с помощью системы ForteBio Octet в кратком изложении описан следующим образом: буфером для иммобилизации и разведения являлся раствор PBS, 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA, pH 7,4, и буфером для разведения аналита являлся раствор 0,02% Tween-20, 0,02% казеина и 0,1% BSA в PBS, pH 7,4. 5 мкг/мл FcγRIIa_H131 иммобилизовали на сенсоре NTA при высоте иммобилизации приблизительно 1,0 нм. Сенсор уравнивали буфером 0,02% Tween-20, 0,02% казеина и 0,1% BSA в PBS, pH 7,4, в течение 300 сек блокирования и определяли связывание иммобилизованного FcγRIIa_H131 на сенсоре с антителами в концентрациях 12,5-200 нМ (серийные двукратные разведения) в течение 60 сек.

Антитело диссоциировало в буфере в течение 60 сек. Сенсор регенерировали в 10 мМ глицине, pH 1,7, и 10 нМ сульфата никеля. Температура составляла 30°C, и частота составляла 0,6 Гц. Данные анализировали с помощью модели аппроксимации 1:1 для получения констант аффинности.

Результаты анализа константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) и контрольного антитела 5C10H2L2-IgG1mt к FcγRIIa_H131 приведены в таблице 4 и на фиг. 16-20.

Таблица 4: Кинетика связывания антител 14C12H1L1 и их изотипов с FcγRIIa_H131

ID образца	K _D (М)	k _{on} (1/Мс)	SE (k _{on})	k _{dis} (1/с)	SE (k _{dis})	Rmax (нм)
14C12H1L1(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
14C12H1L1(hG4)	5,07E-08	2,57E+05	2,37E+04	1,30E-02	6,47E-04	0,18-0,35
14C12H1L1(hG1WT)	5,74E-08	4,65E+05	5,99E+04	2,67E-02	1,24E-03	0,82-1,12
14C12H1L1(hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5C10H2L2-IgG1mt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A означает, что антитело не имело связывания или имело крайне слабый сигнал связывания с антигеном, и таким образом результаты не анализировали и не получали соответствующих данных.

Результаты свидетельствовали о том, что 14C12H1L1(hG4) и 14C12H1L1(hG1WT) связывались с FcγRIIa_H131 с константами аффинности 5,07E-08М и 5,74E-08М, соответственно; 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG1TM) и 5C10H2L2-IgG1mt не имели связывания или имели крайне слабый сигнал связывания с FcγRIIa_H131, и, таким образом, результаты не анализировали и не получали соответствующих данных.

Результаты позволяли предполагать, что связывающие активности 14C12H1L1(hG1DM) и 14C12H1L1(hG1TM) в отношении FcγRIIa_H131 эффективно устранены по сравнению с 14C12H1L1(hG4) и 14C12H1L1(hG1WT).

(2) Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) к FcγRIIa_R131

Fc-рецептор FcγRIIa_R131, также известный как CD32a_R131, может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и участвует в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Связывающая способность терапевтического моноклонального антитела в отношении Fc-рецепторов будет влиять на безопасность и эффективность антитела. В этом эксперименте константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) к FcγRIIa_R131 измеряли с использованием системы ForteBio Octet для оценки связывающей способности антител к Fc-рецептору.

Способ определения константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) к FcγRIIa_R131 с помощью системы ForteBio Octet в кратком изложении описан следующим образом: буфером для иммобилизации и разведения являлся раствор PBS, 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA, pH 7,4, и

буфером для разведения анализата являлся раствор 0,02% Tween-20, 0,02% казеина и 0,1% BSA в PBS, pH 7,4. 5 мкг/мл FcγRIIa_R131 иммобилизовали на сенсоре NTA при высоте иммобилизации приблизительно 1,0 нм. Сенсор уравнивали буфером 0,02% Tween-20, 0,02% казеина и 0,1% BSA в PBS, pH 7,4, в течение 300 сек блокирования, и связывание иммобилизованного FcγRIIa_R131 на сенсоре с антителами в концентрациях 12,5-200 нМ (серийные двукратные разведения) определяли в течение 60 сек. Антитело диссоциировало в буфере в течение 60 сек. Сенсор регенерировали в 10 мМ глицине, pH 1,7, и 10 нМ сульфата никеля. температура составляла 30°C и частота составляла 0,6 Гц. Данные анализировали с помощью модели аппроксимации 1:1 для получения констант аффинности.

Результаты анализа константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) и контрольного антитела 5C10H2L2-IgG1mt к FcγRIIa_R131 приведены в таблице 5 и на фиг. 21-25.

Таблица 5: Кинетика связывания антител 14C12H1L1 и его изотипов с FcγRIIa_R131

Антитело	K_D (М)	k_{on} (1/Мс)	SE (k_{on})	k_{dis} (1/с)	SE (k_{dis})	Rmax (нМ)
14C12H1L1(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
14C12H1L1(hG4)	3,13E-08	3,50E+05	3,05E+04	1,10E-02	6,43E-04	0,21-0,46
14C12H1L1(hG1WT)	3,46E-08	6,60E+05	9,46E+04	2,28E-02	1,33E-03	0,39-0,83
14C12H1L1(hG1TM)	2,32E-07	4,04E+05	9,45E+04	9,38E-02	4,89E-03	0,19-0,35
5C10H2L2-IgG1mt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A означает, что антитело не имело связывания или имело крайне слабый сигнал связывания с антигеном, и таким образом результаты не анализировали и не получали соответствующих данных.

Результаты свидетельствовали о том, что 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) связывались с FcγRIIa_R131 с константами аффинности 3,13E-08М, 3,46E-08М и 2,32E-07М, соответственно; 14C12H1L1(hG1DM) и 5C10H2L2-IgG1mt не имели связывания или имели крайне слабый сигнал связывания с FcγRIIa_R131, и, таким образом, результаты не анализировали и не получали соответствующих данных.

Результаты позволяют предполагать, что среди антител со связывающими активностями, 14C12H1L1(hG1TM) имеет наименьшую связывающую способность и наименьшую связывающую активность в отношении FcγRIIa_R131 по сравнению с 14C12H1L1(hG4) и 14C12H1L1(hG1WT).

Экспериментальный пример 4: Анализ константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) к FcγRIIb

Fc-рецептор FcγRIIb (также известный как CD32b) может связываться с Fc-фрагментом антител IgG, отрицательно регулировать функции иммунных клеток, ингибировать активацию и пролиферацию иммунных клеток и ингибировать секрецию цитокинов. В этом эксперименте константы аффинности антител к FcγRIIb измеряли с

использованием системы Fortebio Octet для оценки связывающей способности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) в отношении Fcγ-рецептора.

Способ определения константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) к FcγRIIb с помощью системы Fortebio Octet в кратком изложении описан следующим образом: буфером для иммобилизации и разведения являлся раствор PBS, 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA, pH 7,4, и буфером для разведения аналита являлся раствор 0,02% Tween-20, 0,02% казеина и 0,1% BSA в PBS, pH 7,4. 5 мкг/мл hFcγRIIb-his иммобилизовали на сенсоре NTA при высоте иммобилизации приблизительно 1,0 нм. Сенсор уравнивали буфером 0,02% Tween-20, 0,02% казеина и 0,1% BSA в PBS, pH 7,4, в течение 300 сек блокирования и определяли связывание иммобилизованного hFcγRIIb-his на сенсоре с антителами в концентрациях 12,5-200 нМ (серийные двукратные разведения) в течение 60 сек. Антитело диссоциировало в буфере в течение 60 сек. Сенсор регенерировали в 10 мМ глицине, pH 1,7, и 10 нМ сульфата никеля. Температура составляла 30°C, и частота составляла 0,6 Гц. Данные анализировали с помощью модели аппроксимации 1:1 для получения констант аффинности.

Результаты анализа константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) и контрольного антитела 5C10H2L2-IgG1mt к FcγRIIb приведены в таблице 6 и на фиг. 26-30.

Таблица 6: Кинетика связывания антител 14C12H1L1 и их изотипов с FcγRIIb

Антитело	K _D (М)	k _{on} (1/Мс)	SE (k _{on})	k _{dis} (1/с)	SE (k _{dis})	Rmax (нм)
14C12H1L1(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
14C12H1L1(hG4)	5,62E-08	2,88E+05	2,94E+04	1,62E-02	7,63E-04	0,22-0,33
14C12H1L1(hG1WT)	6,13E-08	3,18E+05	3,48E+04	1,95E-02	8,96E-04	0,16-0,37
14C12H1L1(hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5C10H2L2-IgG1mt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A означает, что антитело не имело связывания или имело крайне слабый сигнал связывания с антигеном, и таким образом результаты не анализировали и не получали соответствующих данных.

Результаты свидетельствовали о том, что 14C12H1L1(hG4) и 14C12H1L1(hG1WT) связывались с FcγRIIb с константами аффинности 5,62E-08М и 6,13E-08М, соответственно; 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG1TM) и 5C10H2L2-IgG1mt не имели связывания или имели крайне слабый сигнал связывания с FcγRIIb, и, таким образом, результаты не анализировали и не получали соответствующих данных.

Результаты позволяли предполагать, что связывающие активности 14C12H1L1(hG1DM) и 14C12H1L1(hG1TM) в отношении FcγRIIb эффективно устранены по сравнению с 14C12H1L1(hG4) и 14C12H1L1(hG1WT).

Экспериментальный пример 5: Анализ аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) к C1q

Сывороточный компонент комплемента C1q может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и опосредовать эффекты CDC. Связывающая способность терапевтического моноклонального антитела в отношении C1q будет влиять на безопасность и эффективность антитела. В этом эксперименте константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) к C1q измеряли с использованием системы ForteBio Octet для оценки активности CDC антител.

Способ определения константы аффинности антител к C1q с помощью системы ForteBio Octet в кратком изложении описан следующим образом: буфером для разведения образцов являлся раствор 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA в PBS, pH 7,4. 50 мкг/мл антитела иммобилизовали на сенсоре FAB2G при высоте иммобилизации приблизительно 2,0 нм. Сенсор уравнивали буфером в течение 60 сек для блокирования и определяли связывание иммобилизованного антитела на сенсоре с антигеном C1q в концентрациях 1,25-20 нМ (серийные двукратные разведения) в течение 60 сек. Антиген и антитело диссоциировало в буфере в течение 60 сек. Сенсор регенерировали 4 раза в 10 мМ глицине, pH 1,7, по 5 сек. Скорость встряхивания планшета с образцами составляла 1000 об./мин., температура составляла 30°C, и частота составляла 0,6 Гц. Данные анализировали с помощью модели аппроксимации 1:1 для получения констант аффинности. Программным обеспечением для получения данных являлось ForteBio Data Acquisition 7.0, и программным обеспечением для анализа данных являлось ForteBio Data Analysis 7.0.

Результаты анализа константы аффинности 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) и контрольного 5C10H2L2-IgG1mt к C1q приведены в таблице 7 и на фиг. 31-35.

Таблица 7: Кинетика связывания антител 14C12H1L1 и их изотипов с C1q

Антитело	K_D (М)	k_{on} (1/Мс)	SE (k_{on})	k_{dis} (1/с)	SE (k_{dis})	Rmax (нм)
14C12H1L1(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
14C12H1L1(hG4)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
14C12H1L1(hG1WT)	1,35E-09	4,83E+06	4,24E+05	6,54E-03	5,33E-04	0,32-0,53
14C12H1L1(hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5C10H2L2-IgG1mt	4,43E-09	2,38E+06	4,21E+05	1,05E-02	1,10E-03	0,19-0,26

N/A означает, что антитело не имело связывания или имело крайне слабый сигнал связывания с антигеном, и таким образом результаты не анализировали и не получали соответствующих данных.

Результаты свидетельствовали о том, что 14C12H1L1(hG1WT) связывалось с C1q с константой аффинности 1,35E-09М; 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4) и 14C12H1L1(hG1TM) не имели связывания или имели крайне слабый сигнал связывания с

C1q, и, таким образом, результаты не анализировали и не получали соответствующих данных.

Результаты также свидетельствовали о том, что 5C10H2L2-IgG1mt связывалось с C1q с константой аффинности $4,43E-09$, что свидетельствует о том, что оно имеет связывающую активность в отношении C1q и может иметь эффекты CDC.

Экспериментальный пример 6: Фармакодинамические активности 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) в системе сокультивирования моноклеарных клеток периферической крови и клеток Raji-PDL1

В этом эксперименте фармакодинамическую активность антител против PD-1 14C12H1L1 (hG1WT) и 14C12H1L1 (hG1TM) и контрольных антител против PD-L1 5C10H2L2-IgG1mt и ниволумаба в уменьшении иммуносупрессии, опосредованной PD-1/PD-L1, определяли в системе сокультивирования моноклеарных клеток периферической крови и клеток Raji-PDL1.

В реакции смешанной культуры лимфоцитов, когда сокультивируют выделенные моноклеарные клетки периферической крови (включающие иммунные клетки, экспрессирующие иммунокомпетентный PD-1) и клетки Raji-PDL1, экспрессирующие PD-L1, взаимодействие PD-1 и PD-L1 может опосредовать ингибирование функции иммунных клеток, демонстрируя сниженную секрецию цитокинов ИФН γ и ИЛ-2. Антитела против PD-1 или против PD-L1 могут уменьшать такую иммуносупрессию иммунных клеток, что приводит к повышенной секреции цитокинов. Raji является линией В-клеток. Как описано выше, В-клетки можно использовать в качестве антигенпрезентирующих клеток для опосредования иммунного ответа иммунных клеток на опухолевые клетки. В настоящем изобретении систему сокультивирования Raji-PDL1 и PBMC использовали для оценки фармакологической активности антител против PD-1, и систему сокультивирования Raji-PDL1, PBMC и опухолевых клеток использовали для оценки фармакологической активности антител против PD-1 в разных опухолях.

Моноклеарные клетки периферической крови выделяли с помощью Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, кат. № 171440-02), а затем стимулировали SEB (0,5 мкг/мл) в течение двух дней. Стимулированные зрелые моноклеарные клетки периферической крови (1×10^5 клеток/лунку) и клетки Raji-PDL1 (1×10^5 клеток/лунку), обработанные MMC (митомицином С в рабочей концентрации 2 мкг/мл) в течение 1 ч., добавляли на 96-луночный планшет до добавления 14C12H1L1(hG1WT), 14C12H1L1(hG1TM), контрольного антитела ниволумаба или контрольного антитела против PD-L1 5C10H2L2-IgG1mt. Смесь тщательно перемешивали и инкубировали. Через 3 дня супернатант культуры собирали и определяли на секрецию ИФН γ и ИЛ-2 с помощью набора для ELISA (приобретенный в Dakewe Biotech Co., Ltd.).

Результаты анализа секреции ИФН γ в реакции смешанной культуры лимфоцитов приведены на фиг. 36. Результаты свидетельствовали о том, что в системе сокультивирования PBMC и Raji-PDL1 14C12H1L1(hG1TM) индуцировало значимо более

высокую секрецию ИФН γ , чем 14C12H1L1(hG1WT), ниволумаб или 5C10H2L2-IgG1mt на том же уровне доз.

Результаты анализа секреции ИЛ-2 в реакции смешанной культуры лимфоцитов приведены на фиг. 37. Результаты свидетельствовали о том, что в системе сокультивирования PBMC и Raji-PDL1 14C12H1L1(hG1TM) индуцировало значимо более высокую секрецию ИЛ-2, чем 14C12H1L1(hG1WT), ниволумаб или 5C10H2L2-IgG1mt на том же уровне доз.

Результаты позволяли предполагать, что фармакодинамическая активность 14C12H1L1(hG1TM) в уменьшении иммуносупрессии, опосредованной PD-1/PD-L1, значимо превосходит таковую у ниволумаба, 14C12H1L1(hG1WT) или 5C10H2L2-IgG1mt.

Экспериментальный пример 7: Антитело-опосредованные фагоцитарные активности ниволумаба, 14C12H1L1(hG1WT) и 14C12H1L1(hG1TM) в отношении CHO-K1-PD1

Для детекции активности антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) использовали макрофаги мыши в качестве эффекторных клеток и линии клеток, гиперэкспрессирующие PD1, использовали в качестве клеток-мишеней. Костный мозг из бедренной кости мышей Balb/c (приобретенных в Guangdong Medical Laboratory Animal Center) сначала асептически собирали и лизировали лизирующим буфером для эритроцитов на льду в течение 5 мин. Лизис останавливали полной средой DMEM (содержащей 10% FBS), лизат центрифугировали при 1000 об./мин. и дважды промывали. Клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл полной среды DMEM и добавляли М-КСФ в рабочей концентрации 100 нг/мл. Клетки культивировали в течение 7 дней при 37°C и 5% CO $_2$ в культуральной камере для индуцирования. Половину среды заменяли и добавляли М-КСФ в дни 3 и 5. Индуцирование клеток завершали в день 7. Клетки расщепляли 0,25% трипсином. Макрофаги собирали и центрифугировали при 170×g в течение 5 мин. Супернатант выбрасывали, клетки суспендировали в полной среде DMEM (содержащей 10% FBS) и подсчитывали. Клетки доводили до правильной плотности и наполняли ими стерильные пробирки EP для дальнейшего использования.

Клетки CHO-K1-PD1 (линию клеток CHO-K1, гиперэкспрессирующих PD1) центрифугировали при 170×g в течение 5 мин, однократно промывали PBS, ресуспендировали и подсчитывали. Определяли жизнеспособность. Для ресуспендирования клеток сукцинимиდიловый сложный эфир диацетата карбоксифлуоресцеина (CFSE) разводили PBS до 2,5 мкМ (плотность окрашивания: 10 миллионов клеток/мл). Правильное количество клеток инкубировали в клеточном инкубаторе в течение 20 мин. Для прекращения окрашивания добавляли 6 мл полной среды DMEM. Клетки центрифугировали при 170×g в течение 5 мин и выбрасывали супернатант. Добавляли 1 мл полной среды DMEM. Клетки инкубировали в инкубаторе в течение 10 мин и доводили до необходимой для эксперимента плотности. Клетки обозначали как CHO-K-PD1-CFSE.

Тестовые антитела разводили в полной среде DMEM до 20, 2 и 0,2 мкг/мл (рабочие концентрации составляли 10, 1 и 0,1 мкг/мл). Антитело IgG1 против HEL и среду использовали для группы изотипического контроля и группы пустой контрольной пробы. В соответствии с дизайном эксперимента, разведенные антитела и клетки CHO-K1-PD1-CFSE добавляли в пробирки EP 1,5 мл, содержащие макрофаги (конечный альбом составлял 100 мкл, и соотношение эффектор:мишень составляло 50000:150000). Смесь равномерно перемешивали для ресуспендирования и инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 2 ч. В каждую пробирку добавляли 800 мкл PBS, содержащего 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) при комнатной температуре. Смесь центрифугировали при 500×g в течение 5 мин и выбрасывали супернатант. Клетки однократно промывали 800 мкл 1% PBSA. APC-меченое антитело против CD11b мыши/человека (Biolegend, кат. № 101212) разводили в 400 раз PBSA и добавляли в соответствующие образцы в количестве 100 мкл/образец. Смесь тщательно перемешивали, инкубировали на льду в течение 40 мин, промывали 800 мкл 1% PBSA и дважды центрифугировали при 1200×g в течение 5 мин и выбрасывали супернатант. Для ресуспендирования клеток в каждую пробирку добавляли 200 мкл 1% PBSA. Клетки переносили в нагрузочную пробирку и анализировали с помощью проточного цитометра BD FACS Calibur. Макрофаги в системе являлись APC⁺ положительными, и макрофаги, участвующие в фагоцитозе, являлись двойными положительными по APC и CFSE. Показатель фагоцитоза определяли как соотношение количества двойных положительных клеток и количества APC-положительных клеток и оценивали антитело-опосредованную активность ADCP. Активность ADCP в каждой группе, выраженную как P%, вычисляли по следующей формуле:

$$P\% = \frac{\text{Количество макрофагов, участвующих в фагоцитозе}}{\text{Общее количество макрофагов}} \times 100\%$$

Результаты приведены на фиг. 38.

Результаты свидетельствовали о том, что при той же концентрации показатели фагоцитоза 14C12H1L1(hG1WT) и ниволумаба составляли в 3,94 и 4,26 раз больше, чем у антитела против HEL изотипического контроля, соответственно, что свидетельствует о том, что 14C12H1L1 (hG1WT) и ниволумаб имеют эффекты ADCP; и при той же концентрации показатель фагоцитоза 14C12H1L1(hG1TM) был сравнимым с таковым у антитела изотипического контроля, что свидетельствует о том, что 14C12H1L1(hG1TM) не имеет эффекта ADCP.

Результаты позволяют предполагать, что мутация аминокислоты, встроенная в 14C12H1L1(hG1TM), может эффективно устранять эффект ADCP, и достигали неожиданного технического эффекта.

Экспериментальный пример 8: Фармакодинамическая оценка 14C12H1L1(hG1TM) + гидрохлорид анлотиниба в модели на мышах с иммунодефицитом Scid/beige, несущих подкожный ксенотрансплантат немелкоклеточного рака легких человека HCC827

Самок мышей с иммунодефицитом Scid/beige (приобретенных в Vital River) разделяли на группы по 8. К суспензии 1 миллиона/мл PBMC добавляли 0,2 мкг/мл энтеротоксина В *Staphylococcus aureus* (SEB). PBMC инкубировали в течение 3 дней для активации для повышения экспрессии PD1 на PBMC. Мышам подкожно трансплантировали смесь 800000 SEB-активированных PBMC и 6000000 клеток немелкоклеточного рака легких человека HCC827 (приобретенных в GuangZhou Jennio Biotech Co., Ltd.) в день 0 и разделяли их на 2 группы, группу антитела изотипического контроля (т.е. антитела против HEL, полученного Zhongshan Akeso Biopharma, как описано выше) и группу 14C12H1L1(hG1TM) + гидрохлорид анлотиниба. 14C12H1L1(hG1TM) вводили через хвостовую вену раз в неделю (первую дозу вводили подкожно совместно с клетками) и анлотиниб вводили с помощью желудочного зонда раз в сутки в течение 30 дней. Конкретный протокол приведен в таблице 8. Опухоли измеряли непрерывно на протяжении эксперимента и объем вычисляли по формуле: $a \text{ (длина опухоли)} \times b \text{ (ширина опухоли)} \times b \text{ (ширина опухоли)} / 2$.

Таблица 8: Планирование эксперимента и группирование

Группа	n	Модель	Информация о дозировке
Изотипический контроль	7	6000000 клеток HCC827+800000 PBMC (SEB-активированных в течение 3 дней) Подкожный	Антитело против HEL, 10 мг/кг, вводимое через хвостовую вену раз в неделю в количестве 9 доз (первую дозу вводили подкожно совместно с клетками)
14C12H1L1(hG1TM) + анлотиниб	8	ксенотрансплантат (d0)	14C12H1L1(hG1TM), 10 мг/кг, вводимое через хвостовую вену раз в неделю в количестве 9 доз (первую дозу вводили подкожно совместно с клетками) Гидрохлорид анлотиниба, 3 мг/кг, вводимый с помощью желудочного зонда раз в сутки в течение 30 дней

Результаты эксперимента приведены на фиг. 39.

Результаты свидетельствовали о том, что 14C12H1L1(hG1TM) + гидрохлорид анлотиниба значимо ингибировали повышение объема опухоли из клеток немелкоклеточного рака легких человека, что свидетельствует о хороших эффектах уничтожения опухоли.

Экспериментальный пример 9: Фармакодинамическая оценка 14C12H1L1(hG1TM) в модели на мышах C57BL/6-hPD1/hPDL1/hCD73, несущих подкожный трансплантат рака толстого кишечника MC38-hPDL1/hCD73

Линия клеток мыши MC38 представляет собой линию клеток колоректального рака мыши. Показано, что линия клеток MC38 является полезной моделью для исследования опухолей MSI-H/dMMR человека (Efremova M et al., Nat Commun., 2018; 9(1):32).

Самок мышей C57BL/6-hPD1/hPDL1/hCD73 (приобретенных в Nanjing GemPharmatech Co., Ltd.) разделяли на группы по 8 и подкожно трансплантировали им в правую переднюю конечность клетки рака толстого кишечника MC38-hPDL1/hCD73 (приобретенные в Nanjing GemPharmatech Co., Ltd.) (2×10^6 клеток/100 мкл/мышь). День трансплантации определяли как D0. Объем дозы корректировали в соответствии с массой тела: 10 мкл/г массы тела мыши (г). Антитело против HEL (получение и источник являются такими же, как в экспериментальном примере 8) или 14C12H1L1(hG1TM) вводили интраперитонеально дважды в неделю в течение 3 недель всего в количестве 6 доз. Конкретный протокол приведен в таблице 9. Опухоли измеряли непрерывно на протяжении эксперимента и объем вычисляли по следующей формуле: объем опухоли (мм^3) = (длина опухоли $\times$ (ширина опухоли) 2)/2.

Таблица 9: Протокол и группирование

Группа	N	Доза (мг/кг)	Частота	Цикл
Изотипический контроль	8	10	BIW* 3	Всего 6 доз
14C12H1L1(hG1TM)	8	1	BIW*3	Всего 6 доз

Результаты эксперимента приведены на фиг. 40.

Результаты свидетельствовали о том, что по сравнению с антителом изотипического контроля, ингибировали рост опухоли, что свидетельствует о том, что 14C12H1L1(hG1TM) может значимо ингибировать пролиферацию клеток MC38, и с помощью него можно эффективно лечить солидные опухоли фенотипа MSI-H/dMMR, таких как рак толстого кишечника и/или рак прямой кишки.

Экспериментальный пример 10: Эффективно усиленный иммунный ответ иммунных клеток на клетки рака желудка человек КАТО III под действием 14C12H1L1(hG1TM)

PBMC выделяли из периферической крови здорового человека по инструкциям к реагенту Ficoll-PaqueTM Plus и выделенные PBMC подсчитывали и замораживали. Клетки Raji-PDL1 культивировали в полной среде RPMI 1640+10% FBS, а клетки КАТО III (приобретенный в Chinese Academy of Sciences Shanghai Cell Bank) культивировали в полной среде DMEM+10% FBS. PBMC размораживали и активировали 0,5 мкг/мл SEB в течение двух дней. В день эксперимента клетки Raji-PDL1 обрабатывали 2 мкг/мл MMC в течение 1 ч. SEB-активированные PBMC и обработанные MMC клетки Raji-PDL1 собирали, дважды промывали PBS, ресуспендировали в полной среде RPMI 1640+10% FBS и подсчитывали. Клетки Raji-PDL1 и PBMC высевали на 96-луночные планшеты в

количестве 1×10^5 клеток/лунку. Клетки КАТО III в фазе логарифмического роста собирали и высевали на 96-луночный планшет в количестве 5×10^4 клеток/лунку. Разведенное антитело добавляли в соответствии с дизайном эксперимента. Смесь равномерно перемешивали и инкубировали в инкубаторе при 5% CO₂ и 37°C в течение 3 дней. Через 3 дня супернатант культуры клеток собирали и тестировали на ИЛ-2 по инструкциям к набору для ELISA. Все среды в этом эксперименте представляли собой 10% FBS+RPMI 1640.

Результаты эксперимента приведены на фиг. 41.

Результаты свидетельствовали о том, что 14C12H1L1(hG1TM), сокультивируемое с клетками рака желудка человека КАТО III, демонстрировало более высокую фармакологическую активность по сравнению с 14C12H1L1(hG1WT) или ниволумабом. 14C12H1L1(hG1TM) может стимулировать PBMC для секреции большего количества ИЛ-2 при той же концентрации, что свидетельствует о потенциале для лечения рака желудка.

Экспериментальный пример 11: Эффективно усиленный иммунный ответ иммунных клеток на клетки рака носоглотки CNE-2Z под действием 14C12H1L1(hG1TM)

Клетки Raji-PDL1, CNE-2Z (приобретенные в GuangZhou Jennio Biotech Co., Ltd.) и PBMC размораживали, при этом PBMC стимулировали SEB (0,5 мкг/мл) в течение двух дней после 2 часов размораживания. В день эксперимента клетки Raji-PDL1 обрабатывали MMC (митомицином C при рабочей концентрации 2 мкг/мл и рабочей плотности клеток 200×10^4 клеток/мл) в течение 1 ч. Собирали PBMC и обработанные клетки Raji-PDL1 дважды промывали PBS. Клетки PBMC и Raji-PDL1 добавляли в планшет для культивирования клеток в количестве 10×10^4 клеток/лунку, и клетки CNE-2Z добавляли в количестве 3×10^4 клеток/лунку. Антитела (с конечной концентрации 300 нМ и конечным объемом 200 мкл) добавляли в соответствии с дизайном эксперимента и сокультивировали с клетками в течение 3 дней. Супернатант культуры собирали и анализировали на ИЛ-2. Все среды в этом эксперименте представляли собой 10% FBS+RPMI 1640.

Результаты приведены на фиг. 42.

Результаты свидетельствовали о том, что 14C12H1L1(hG1TM), сокультивируемое с клетками рака носоглотки человека CNE-2Z, демонстрировало более высокую фармакологическую активность по сравнению с 14C12H1L1(hG1WT). 14C12H1L1(hG1TM) может стимулировать PBMC для секреции большего количества ИЛ-2 при той же концентрации, что свидетельствует о потенциале для лечения рака носоглотки.

Экспериментальный пример 12: Эффективно усиленный иммунный ответ иммунных клеток на клетки мезотелиомы NCI-H2452 под действием 14C12H1L1(hG1TM)

Клетки Raji-PDL1, NCI-H2452 (приобретенные в Chinese Academy of Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences) и PBMC размораживали, при этом PBMC стимулировали SEB (0,5 мкг/мл) в течение двух дней после 2 часов размораживания. В день эксперимента клетки Raji-PDL1 обрабатывали MMC (митомицином C при рабочей

концентрации 2 мкг/мл и рабочей плотности клеток 200×10^4 клеток/мл) в течение 1 ч. Собирали PBMC и обработанные клетки Raji-PDL1 дважды промывали PBS. PBMC и клетки Raji-PDL1 добавляли в планшет для культивирования клеток в количестве 10×10^4 клеток/лунку и NCI-H2452 клетки добавляли в количестве 3×10^4 клеток/лунку. Антитела (с конечной концентрации 300 нМ и конечным объемом 200 мкл) добавляли в соответствии с дизайном эксперимента, и сокультивировали с клетками в течение 3 дней. Супернатант культуры собирали и анализировали на ИЛ-2. Все среды в этом эксперименте представляли собой 10% FBS+RPMI 1640.

Результаты приведены на фиг. 43.

Результаты свидетельствовали о том, что 14C12H1L1(hG1TM), сокультивируемое с клетками мезотелиомы человека NCI-H2452, демонстрировало более высокую фармакологическую активность по сравнению с 14C12H1L1(hG1WT). 14C12H1L1(hG1TM) может стимулировать PBMC для секреции большего количества ИЛ-2 при той же концентрации, что свидетельствует о потенциале для лечения мезотелиомы.

Экспериментальный пример 12: Эффективно усиленный иммунный ответ иммунных клеток на клетки мелкоклеточного рака легких NCI-H446 под действием 14C12H1L1(hG1TM)

PBMC выделяли из периферической крови здорового человека по инструкциям к реагенту Ficoll-PaqueTM Plus и выделенные PBMC подсчитывали и замораживали. Клетки Raji-PDL1 и NCI-H446 (приобретенные в Chinese Academy of Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences) культивировали в полной среде RPMI 1640+10% FBS. PBMC размораживали и активировали 0,5 мкг/мл SEB в течение двух дней. В день эксперимента клетки Raji-PDL1 обрабатывали 2 мкг/мл MMC в течение 1 ч. SEB-активированные PBMC и обработанные MMC клетки Raji-PDL1 собирали, дважды промывали PBS, ресуспендировали в полной среде RPMI 1640+10% FBS и подсчитывали. Клетки Raji-PDL1 и PBMC высевали на 96-луночные планшеты в количестве 1×10^5 клеток/лунку. Клетки NCI-H446 в фазе логарифмического роста собирали и высевали на 96-луночный планшет в количестве 8×10^4 клеток/лунку. Разведенное антитело добавляли в соответствии с дизайном эксперимента. Смесь равномерно перемешивали и инкубировали в инкубатор при 5% CO₂ и 37°C в течение 3 дней. Через 3 дня супернатант культуры клеток собирали и тестировали на ИЛ-2 по инструкциям к набору для ELISA. Все среды в этом эксперименте представляли собой 10% FBS+RPMI 1640.

Результаты приведены на фиг. 44.

Результаты свидетельствовали о том, что 14C12H1L1(hG1TM,) сокультивируемое с клетками мелкоклеточного рака легких человека NCI-H446, демонстрировало эквивалентную или более высокую фармакологическую активность по сравнению с 14C12H1L1(hG1WT) и ниволумабом с учетом эффективного устранения активностей ADCC, CDC и ADCP. 14C12H1L1(hG1TM) может стимулировать PBMC для секреции эквивалентного или большего количества ИЛ-2 при той же концентрации, что свидетельствует о потенциале для лечения мелкоклеточного рака легких.

Экспериментальный пример 13: Эффективно усиленный иммунный ответ иммунных клеток на клетки рака носоглотки человека CNE-2Z под действием 14C12H1L1(hG1TM) в комбинации с гидрохлоридом анлотиниба

PBMC выделяли из периферической крови здорового человека по инструкциям к реагенту Ficoll-PaqueTM Plus и выделенные PBMC подсчитывали и замораживали. Клетки Raji-PDL1 и CNE-2Z (приобретенные в GuangZhou Jennio Biotech Co., Ltd.) культивировали в полной среде RPMI 1640+10% FBS. PBMC размораживали и активировали 0,5 мкг/мл SEB в течение двух дней. В день эксперимента клетки Raji-PDL1 обрабатывали 2 мкг/мл MMC в течение 1 ч. SEB-активированные PBMC и обработанные MMC клетки Raji-PDL1 собирали, дважды промывали PBS, ресуспендировали в полной среде RPMI 1640+10% FBS и подсчитывали. Клетки Raji-PDL1 и PBMC высевали на 96-луночные планшеты в количестве 1×10^5 клеток/лунку. Клетки CNE-2Z в фазе логарифмического роста собирали и высевали на 96-луночный планшет в количестве 3×10^4 клеток/лунку. Разведенные антитела и анлотиниб добавляли в соответствии с дизайном эксперимента. Смесь равномерно перемешивали и инкубировали в инкубаторе при 5% CO₂ или 37°C в течение 3 дней. Через 3 дня супернатант культуры клеток собирали и тестировали на ИЛ-2 по инструкциям к набору для ELISA. Все среды в этом эксперименте представляли собой 10% FBS+RPMI 1640.

Результаты приведены на фиг. 45. По сравнению с антителом против HEL и монотерапией анлотинибом, 14C12H1L1(hG1TM), 14C12H1L1(hG1WT) и ниволумаб значительно усиливали иммунный ответ иммунных клеток на клетки рака носоглотки человека CNE-2Z, отличающийся значительно повышенным уровнем секреции. 14C12H1L1(hG1TM) имеет фармакологическую активность, превосходящую таковую у 14C12H1L1(hG1WT) и ниволумаба.

Кроме того, фармакологическая активность 14C12H1L1(hG1TM) в комбинации с анлотинибом при стимуляции активации иммунных клеток превосходила таковую у монотерапии 14C12H1L1(hG1TM), монотерапии 14C12H1L1(hG1WT) и монотерапии ниволумабом, а также превосходила таковую у 14C12H1L1(hG1WT) в комбинации с анлотинибом и ниволумаба в комбинации с анлотинибом.

Указанные выше результаты свидетельствовали о том, что 14C12H1L1(hG1TM) в комбинации с анлотинибом обладает потенциалом для лечения рака носоглотки человека.

Экспериментальный пример 14: Значимо усиленный иммунный ответ иммунных клеток на опухолевые клетки SW48 с MSI-H/dMMR под действием 14C12H1L1(hG1TM) в комбинации с анлотинибом

SW48 является линией клеток колоректального рака человек, у которой идентифицирован фенотип MSI-H/dMMR (Branch P et al., (1995), Cancer Res, 55(11): 2304-2309). Ее использовали для детекции усиленного ответа иммунных клеток на опухоль фенотипа MSI-H/dMMR под действием 14C12H1L1(hG1TM).

PBMC выделяли из периферической крови здорового человека по инструкциям к реагенту Ficoll-PaqueTM Plus и выделенные PBMC подсчитывали и замораживали. Клетки

Raji-PDL1 культивировали в полной среде RPMI 1640+10% FBS, и клетки SW48 (приобретенные в GuangZhou Jennio Biotech Co., Ltd.) культивировали в полной среде DMEM+10% FBS. PBMC размораживали и активировали 0,5 мкг/мл SEB в течение двух дней. В день эксперимента клетки Raji-PDL1 обрабатывали 2 мкг/мл MMC в течение 1 ч. SEB-активированные PBMC и обработанные MMC клетки Raji-PDL1 собирали, дважды промывали PBS, ресуспендировали в полной среде RPMI 1640+10% FBS и подсчитывали. Клетки Raji-PDL1 и PBMC высевали на 96-луночные планшеты в количестве 1×10^5 клеток/лунку. Клетки SW48 в фазе логарифмического роста собирали и высевали на 96-луночный планшет в количестве 2×10^5 клеток/лунку. Разведенное антитело и анлотиниб добавляли в соответствии с дизайном эксперимента. Смесь равномерно перемешивали и инкубировали в инкубаторе при 5% CO₂ и 37°C в течение 3 дней. Через 3 дня супернатант культуры клеток собирали и тестировали на ИЛ-2 по инструкциям к набору для ELISA. Все среды в этом эксперименте представляли собой 10% FBS+RPMI 1640.

Результаты приведены на фиг. 46.

Результаты свидетельствовали о том, что 14C12H1L1(hG1TM), 14C12H1L1(hG1WT) и ниволумаб значимо усиливали иммунный ответ иммунных клеток на клетки колоректального рака человек SW48 фенотипа MSI-H/dMMR, отличающийся значимо повышенным уровнем секреции ИЛ-2, по сравнению с антителом против HEL. 14C12H1L1(hG1TM) имеет фармакологическую активность, превосходящую таковую у 14C12H1L1(hG1WT).

Кроме того, фармакологическая активность 14C12H1L1(hG1TM) в комбинации с анлотинибом в стимуляции активации иммунных клеток превосходила таковую у монотерапии 14C12H1L1(hG1WT), монотерапии 14C12H1L1(hG1TM) и монотерапии ниволумабом, а также превосходила таковую у 14C12H1L1(hG1WT) в комбинации с анлотинибом и ниволумаба в комбинации с анлотинибом.

Указанные результаты свидетельствовали о том, что 14C12H1L1(hG1TM) в комбинации с анлотинибом обладает потенциалом для лечения солидной опухоли фенотипа MSI-H/dMMR, в частности, рака толстого кишечника и/или рака прямой кишки фенотипа MSI-H/dMMR.

Экспериментальный пример 15: Значимо усиленный иммунный ответ иммунных клеток на клетки колоректального рака человек SW837 фенотипа MSI-H/dMMR под действием 14C12H1L1(hG1TM)

SW837 является линией клеток колоректального рака человека фенотипа не-MSI-H/dMMR (т.е. MSS) (Guo J et al., Cancer Res., 2011;71(8):2978-2987), и ее использовали в этом примере для детекции усиленного ответа иммунных клеток на опухоль фенотипа не-MSI-H/dMMR под действием 14C12H1L1(hG1TM).

PBMC выделяли из периферической крови здорового человека по инструкциям к реагенту Ficoll-PaqueTM Plus и выделенные PBMC подсчитывали и замораживали. Клетки Raji-PDL1 культивировали в полной среде RPMI 1640+10% FBS и клетки SW837 (приобретенный в Shanghai Honsun Biological Technology Co., Ltd) культивировали в 10%

FBS+полная среда Лейбовица L-15 (приобретенные в Gibco). PBMC размораживали и активировали 0,5 мкг/мл SEB в течение двух дней. В день эксперимента клетки Raji-PDL1 обрабатывали 2 мкг/мл MMC в течение 1 ч. SEB-активированные PBMC и обработанные MMC клетки Raji-PDL1 собирали, дважды промывали PBS, ресуспендировали в полной среде RPMI 1640+10% FBS и подсчитывали. Клетки Raji-PDL1 и PBMC высевали на 96-луночные планшеты в количестве 1×10^5 клеток/лунку. Клетки SW837 в фазе логарифмического роста собирали и высевали на 96-луночный планшет в количестве 5×10^4 клеток/лунку. Разведенное антитело добавляли в соответствии с дизайном эксперимента. Смесь равномерно перемешивали и инкубировали в инкубаторе при 5% CO₂ и 37°C в течение 3 дней. Через 3 дня супернатант культуры клеток собирали и тестировали на ИЛ-2 по инструкциям к набору для ELISA.

Результаты приведены на фиг. 47.

Результаты свидетельствовали о том, что 14C12H1L1(hG1TM), 14C12H1L1(hG1WT) и ниволумаб значимо усиливали иммунный ответ иммунных клеток на клетки колоректального рака человека SW837 фенотипа не-MSI-H/dMMR. Фармакологическая активность 14C12H1L1(hG1TM) в группах средней и высокой дозы превосходила таковую у 14C12H1L1(hG1WT), отличаясь значимо повышенным уровнем секреции ИЛ-2.

Указанные результаты свидетельствовали о том, что 14C12H1L1(hG1TM) имело лучшую или эквивалентную фармакологическую активность относительно 14C12H1L1(hG1WT) и ниволумаба на основе эффективного устранения эффектов ADCC, CDC или ADCP, что свидетельствует о потенциале для лечения солидной опухоли фенотипа не-MSI-H/dMMR (т.е. MSS), в частности, рака толстого кишечника и/или рака прямой кишки фенотипа не-MSI-H/dMMR.

Экспериментальный пример 16: Значимо усиленный иммунный ответ иммунных клеток на клетки колоректального рака человека SW837 фенотипа MSI-H/dMMR под действием 14C12H1L1(hG1TM) в комбинации с анлотинибом

PBMC выделяли из периферической крови здорового человека по инструкциям к реагенту Ficoll-PaqueTM Plus и выделенные PBMC подсчитывали и замораживали. Клетки Raji-PDL1 культивировали в полной среде RPMI 1640+10% FBS и клетки SW837 культивировали в полной среде Лейбовица L-15+10% FBS. PBMC размораживали и активировали 0,5 мкг/мл SEB в течение двух дней. В день эксперимента клетки Raji-PDL1 обрабатывали 2 мкг/мл MMC в течение 1 ч. SEB-активированные PBMC и обработанные MMC клетки Raji-PDL1 собирали, дважды промывали PBS, ресуспендировали в полной среде RPMI 1640+10% FBS и подсчитывали. Клетки Raji-PDL1 и PBMC высевали на 96-луночные планшеты в количестве 1×10^5 клеток/лунку. Клетки SW837 в фазе логарифмического роста собирали и высевали на 96-луночный планшет в количестве 5×10^4 клеток/лунку. Разведенное антитело добавляли в соответствии с дизайном эксперимента. Смесь равномерно перемешивали и инкубировали в инкубаторе при 5%

CO₂ и 37°C в течение 3 дней. Через 3 дня супернатант культуры клеток собирали и тестировали на ИЛ-2 по инструкциям к набору для ELISA.

Результаты приведены на фиг. 48.

Результаты свидетельствуют о том, что, по сравнению с 14C12H1L1(hG1WT) в комбинации с анлотинибом и ниволумабом в комбинации с анлотинибом, 14C12H1L1(hG1TM) в комбинации с анлотинибом значимо усиливало иммунный ответ иммунных клеток на клетки колоректального рака человека SW837 фенотипа не-MSI-H/dMMR, отличающийся значимо повышенным уровнем секреции, что свидетельствует о превосходном терапевтическом эффекте в отношении солидных опухолей фенотипа не-MSI-H/dMMR, в частности рака толстого кишечника и/или рака прямой кишки фенотипа не-MSI-H/dMMR.

Хотя конкретные варианты осуществления настоящего изобретения подробно описаны, специалистам в этой области будет понятно, что можно осуществлять различные модификации и замены в соответствии со всеми описанными идеями, и все эти изменения входят в объем настоящего изобретения. Полный объем настоящего изобретения представлен в сопутствующей формуле изобретения и любом ее эквиваленте.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, где

вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 19-21, соответственно, и вариабельная область легкой цепи антитела содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 22-24, соответственно;

антитело принадлежит подтипу IgG1 человека;

где по системе нумерации EU константная область тяжелой цепи антитела содержит мутации в любых 2 или 3 из положений 234, 235 и 237, и константа аффинности антитела к FcγRIIIa и/или C1q снижается после мутации по сравнению с аффинностью до мутации; предпочтительно, константу аффинности измеряют с помощью системы Fortebio Octet.

2. Антитело по п.1, где по системе нумерации EU константная область тяжелой цепи антитела содержит следующие мутации:

L234A и L235A;

L234A и G237A;

L235A и G237A;

или

L234A, L235A и G237A.

3. Антитело, где

вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 19-21, соответственно, и вариабельная область легкой цепи антитела содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 22-24, соответственно;

антитело принадлежит подтипу IgG1 человека;

где по системе нумерации EU константная область тяжелой цепи антитела содержит следующие мутации:

L234A и L235A;

L234A и G237A;

L235A и G237A;

или

L234A, L235A и G237A.

4. Антитело по любому из пп.1-3, где по системе нумерации EU константная область тяжелой цепи антитела дополнительно содержит одну или более мутаций, выбранных из:

N297A, D265A, D270A, P238D, L328E, E233D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, T394D, G236R, G236A, L328R, A330S, P331S, H268A,

E318A и K320A.

5. Антитело по любому из пп.1-4, где

вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 6; и

вариабельная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 8.

6. Антитело по любому из пп.1-4, где

вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, и вариабельная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4;

вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, и вариабельная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8;

вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, и вариабельная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4;

или

вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, и вариабельная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8.

7. Антитело по любому из пп.1-6, где

тяжелая цепь приведена в SEQ ID NO: 16, и легкая цепь приведена в SEQ ID NO: 12;

или

тяжелая цепь приведена в SEQ ID NO: 18, и легкая цепь приведена в SEQ ID NO: 12.

8. Антитело по любому из пп.1-7, где антитело связывается с FcγRIIIa_F158, FcγRI, FcγRIIa_H131, FcγRIIa_V158 и/или FcγRIIb с константой аффинности более приблизительно 10^{-7} М, например, более приблизительно 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М или более; предпочтительно, константу аффинности измеряют с помощью системы Fortebio Octet;

предпочтительно, антитело не имеет сигнала связывания или имеет сигнал связывания с FcγRIIIa_F158, FcγRI, FcγRIIa_H131, FcγRIIa_V158 и/или FcγRIIb менее 0,1 нм; предпочтительно, термин "сигнал связывания" относится к ответу, измеряемому с помощью системы Fortebio Octet.

9. Антитело по любому из пп.1-8, где антитело связывается с C1q с константой аффинности более приблизительно 10^{-9} М, например, более приблизительно 10^{-8} М, 10^{-7} М, 10^{-6} М, 10^{-5} М или более; предпочтительно, константу аффинности измеряют с помощью системы Fortebio Octet;

предпочтительно, антитело не имеет сигнала связывания или имеет сигнал связывания с C1q менее 0,1 нм; предпочтительно, термин "сигнал связывания" относится к ответу, измеряемому с помощью системы Fortebio Octet.

10. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело по любому из пп.1-9.

11. Вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.10.

12. Клетка-хозяин, содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.10 или вектор по п.11.

13. Конъюгат, содержащий антитело по любому из пп.1-9 и конъюгированный остаток, где конъюгированный остаток является детектируемой меткой; предпочтительно, конъюгированный остаток является радиоактивным изотопом, флуоресцентным веществом, люминесцентным веществом, цветным веществом или ферментом.

14. Набор, содержащий антитело по любому из пп.1-9 или конъюгат по п.13;

где, предпочтительно, набор дополнительно содержит второе антитело, специфически распознающее антитело; необязательно, второе антитело дополнительно содержит детектируемую метку, например, радиоактивный изотоп, флуоресцентное вещество, люминесцентное вещество, цветное вещество или фермент.

15. Применение антитела по любому из пп.1-9 или конъюгата по п.13 в получении набора для детекции наличия или уровня PD-1 в образце.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-9 или конъюгат по п.13, где, необязательно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

17. Фармацевтическая композиция по п.16, дополнительно содержащая одно или более противоопухолевых химиотерапевтических средств;

предпочтительно, противоопухолевое химиотерапевтическое средство является ингибитором тирозинкиназ; более предпочтительно, противоопухолевое химиотерапевтическое средство является анлотинибом или его фармацевтически приемлемой солью (например, гидрохлоридом) или ленватинибом или его фармацевтически приемлемой солью (например, мезилатом).

18. Фармацевтическая композиция по п.16 или 17, где однократная доза фармацевтической композиции составляет 100-1000 мг, 200-800 мг, 200-500 мг, 300-600 мг, 400-500 мг или 450 мг, с учетом массы антитела.

19. Терапевтическая комбинация, содержащая антитело по любому из пп.1-9 и по меньшей мере одно (например, 1, 2 или 3) противоопухолевое химиотерапевтическое средство.

20. Терапевтическая комбинация по п.19, где противоопухолевое химиотерапевтическое средство является ингибитором тирозинкиназ; предпочтительно, противоопухолевое химиотерапевтическое средство является анлотинибом или его фармацевтически приемлемой солью (например, гидрохлоридом) или ленватинибом или его фармацевтически приемлемой солью (например, мезилатом).

21. Терапевтическая комбинация по п.19 или 20, где однократная доза антитела составляет 100-1000 мг, 200-800 мг, 200-500 мг, 300-600 мг, 400-500 мг или 450 мг.

22. Терапевтическая комбинация по п.19 или 20, где однократная доза

противоопухолевого химиотерапевтического средства составляет 0,1-100 мг, 0,5-50 мг, 1-20 мг, 2-15 мг, 4-12 мг или 8-12 мг.

23. Терапевтическая комбинация по любому из пп.19-22, где

терапевтическая комбинация является фиксированной комбинацией, например, в форме твердой фармацевтической композиции или жидкой фармацевтической композиции; или

терапевтическая комбинация является нефиксированной комбинацией, например, каждое из антитела против PD-1 и противоопухолевого химиотерапевтического средства в нефиксированной комбинации находится в форме фармацевтической композиции.

24. Набор, содержащий: фармацевтическую композицию по любому из пп.16-18 или терапевтическую комбинацию по любому из пп.19-23 и вкладыш в упаковку.

25. Применение антитела по любому из пп.1-9, конъюгата по п.13, фармацевтической композиции по любому из пп.16-18 или терапевтической комбинации по любому из пп.19-23 в получении лекарственного средства для лечения и/или профилактики опухоли или анемии или получении лекарственного средства для диагностики опухоли или анемии, где, предпочтительно, опухоль выбрана из одной или более из меланомы, рака почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака толстого кишечника, рака прямой кишки, рака желудка, рака печени, рака легких, рака яичников, лейкоза, рака носоглотки и рака эндометрия;

предпочтительно, рак легких выбран из одного или более из немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких и плоскоклеточного рака легких;

предпочтительно, рак желудка является аденокарциномой желудка или аденокарциномой пищеводно-желудочного соединения;

предпочтительно, опухоль является солидной опухолью фенотипа MSI-H/dMMR; предпочтительно, опухоль выбрана из одной или более из следующих опухолей фенотипа MSI-H/dMMR:

рака толстого кишечника, рака прямой кишки, рака эндометрия, рака желудка, мезотелиомы, саркомы, карциномы коры надпочечников, злокачественной меланомы и эмбрионально-клеточной опухоли яичников.

26. Применение антитела по любому из пп.1-9, конъюгата по п.13, фармацевтической композиции по любому из пп.16-18 или терапевтической комбинации по любому из пп.19-23 в получении:

лекарственного средства для блокирования связывания PD-1 с PD-L1,

лекарственного средства для отрицательной регуляции активности или уровня PD-1,

лекарственного средства для уменьшения иммуносупрессии PD-1 в организме, или

лекарственного средства для повышения экспрессии ИФН γ и/или ИЛ-2 в Т-лимфоцитах.

27. Антитело по любому из пп.1-9, конъюгат по п.13, фармацевтическая композиция по любому из пп.16-18 или терапевтическая комбинация по любому из пп.19-

23 для применения в лечении и/или профилактике опухоли или анемии или для применения в диагностике опухоли или анемии, где, предпочтительно, опухоль выбрана из одной или более из меланомы, рака почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака толстого кишечника, рака прямой кишки, рака желудка, рака печени, рака легких, рака яичников, лейкоза, рака носоглотки и рака эндометрия;

предпочтительно, рак легких выбран из одного или более из немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких и плоскоклеточного рака легких;

предпочтительно, рак желудка является аденокарциномой желудка или аденокарциномой пищеводно-желудочного соединения;

предпочтительно, опухоль является солидной опухолью фенотипа MSI-H/dMMR; предпочтительно, опухоль выбрана из одной или более из следующих опухолей фенотипа MSI-H/dMMR:

рака толстого кишечника, рака прямой кишки, рака эндометрия, рака желудка, мезотелиомы, саркомы, карциномы коры надпочечников, злокачественной меланомы и эмбрионально-клеточной опухоли яичников.

28. Способ лечения и/или профилактики опухоли или анемии или способ диагностики опухоли или анемии, включающий: введение нуждающемуся в этом индивидууму эффективного количества антитела по любому из пп.1-9, конъюгата по п.13, фармацевтической композиции по любому из пп.16-18 или терапевтической комбинации по любому из пп.19-23, где, предпочтительно, опухоль выбрана из одной или более из меланомы, рака почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака толстого кишечника, рака прямой кишки, рака желудка, рака печени, рака легких, рака яичников, лейкоза, рака носоглотки и рака эндометрия;

предпочтительно, рак легких выбран из одного или более из немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких и плоскоклеточного рака легких;

предпочтительно, рак желудка является аденокарциномой желудка или аденокарциномой пищеводно-желудочного соединения;

предпочтительно, опухоль является солидной опухолью фенотипа MSI-H/dMMR; предпочтительно, опухоль выбрана из одной или более из следующих опухолей фенотипа MSI-H/dMMR:

рака толстого кишечника, рака прямой кишки, рака эндометрия, рака желудка, мезотелиомы, саркомы, карциномы коры надпочечников, злокачественной меланомы и эмбрионально-клеточной опухоли яичников.

29. Способ по п.28, где эффективное количество антитела вводят нуждающемуся в этом индивидууму до или после хирургического лечения и/или до или после лучевой терапии.

30. Способ по п.28 или 29, где однократная доза антитела составляет 0,1-100 мг на кг массы тела, предпочтительно - 1-10 мг на кг массы тела; альтернативно, однократная доза антитела составляет 10-1000 мг, предпочтительно - 50-500 мг, для каждого индивидуума;

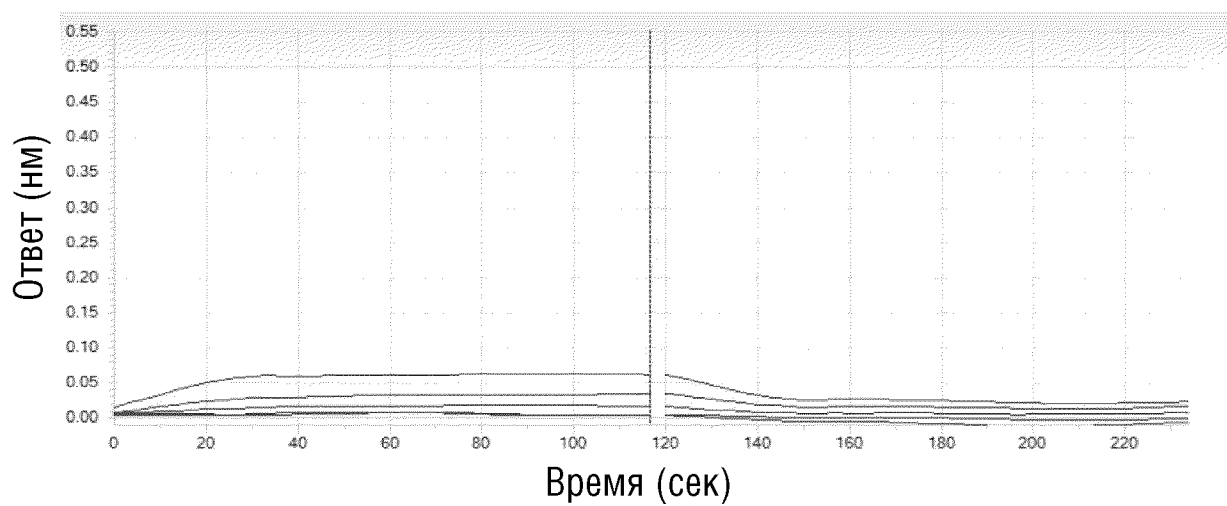
предпочтительно, дозу вводят раз в 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 10 дней, 1 неделю, 2 недели или 3 недели;

предпочтительно, путем введения является внутривенная капельная инфузия или внутривенная инъекция.

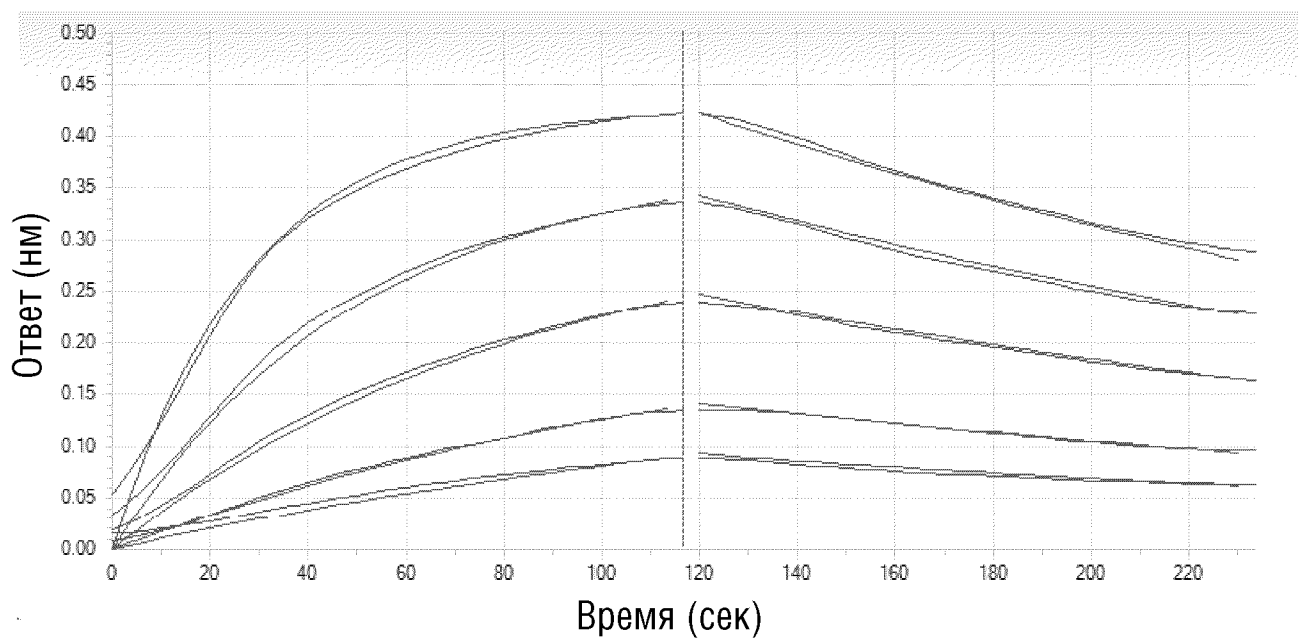
31. Способ по любому из пп.28-30, где введение антитела осуществляют циклами по 2 или 3 недели и, предпочтительно, антитело вводят внутривенно в первый день каждого цикла; предпочтительно, антитело вводят раз каждые две или три недели.

По доверенности

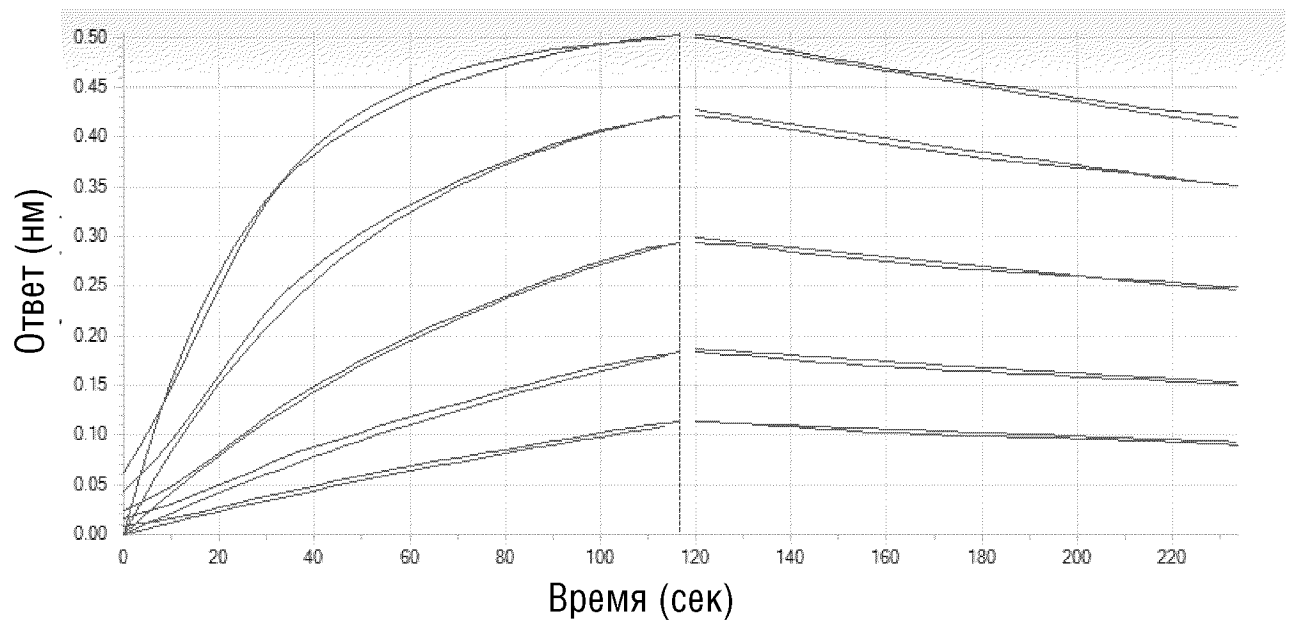
ФИГ.1



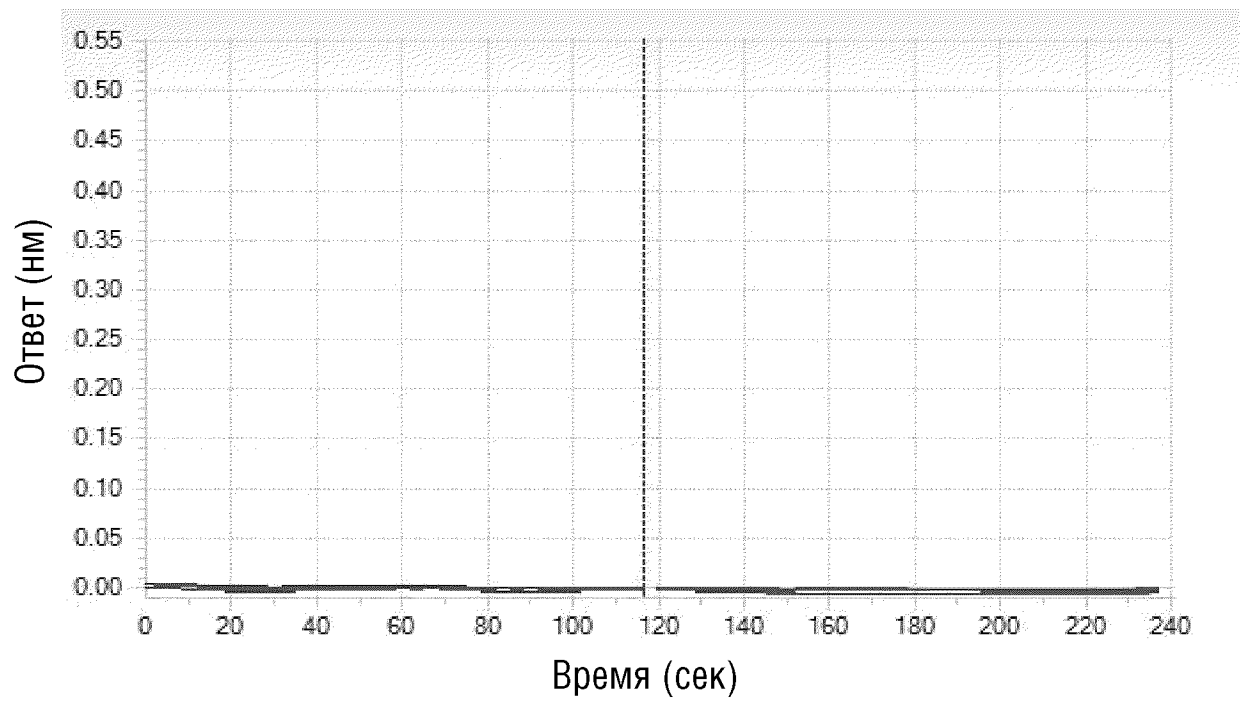
ФИГ.2



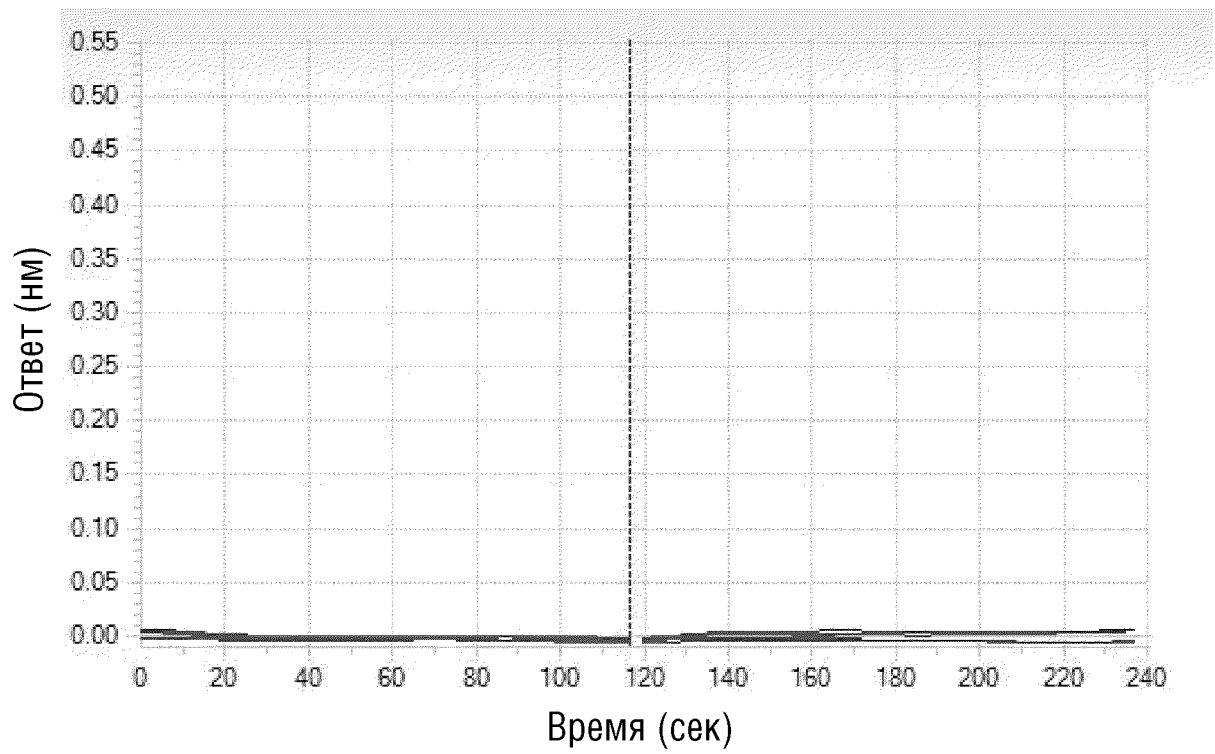
ФИГ.3



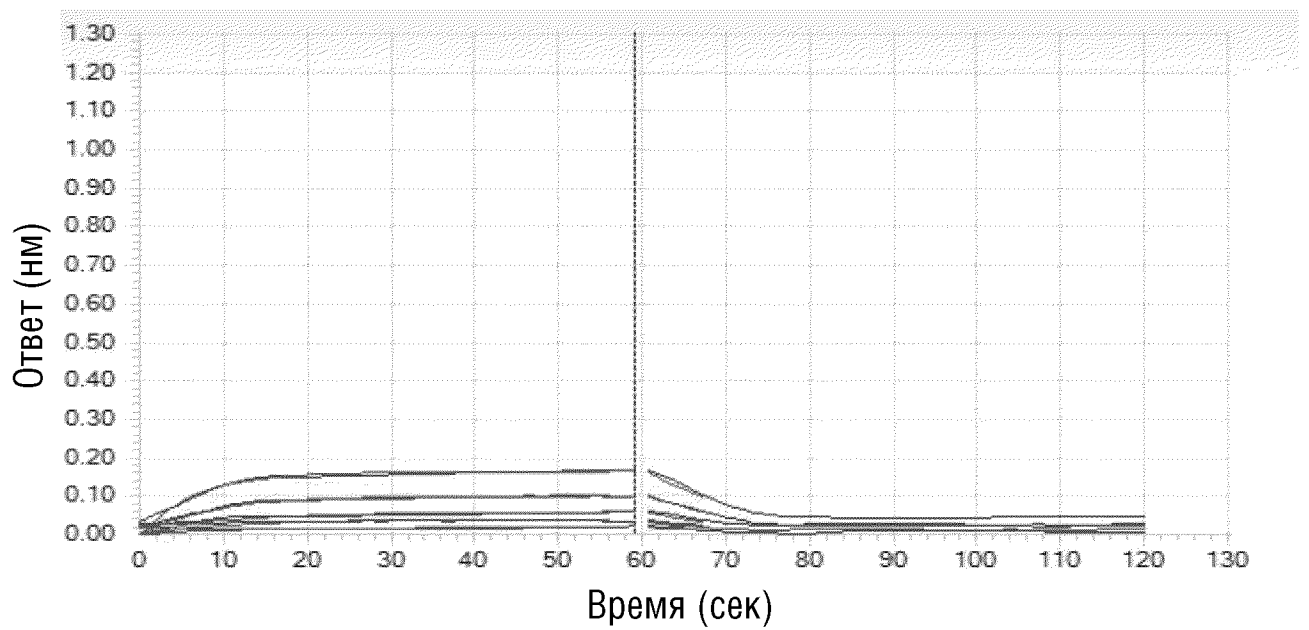
ФИГ.4



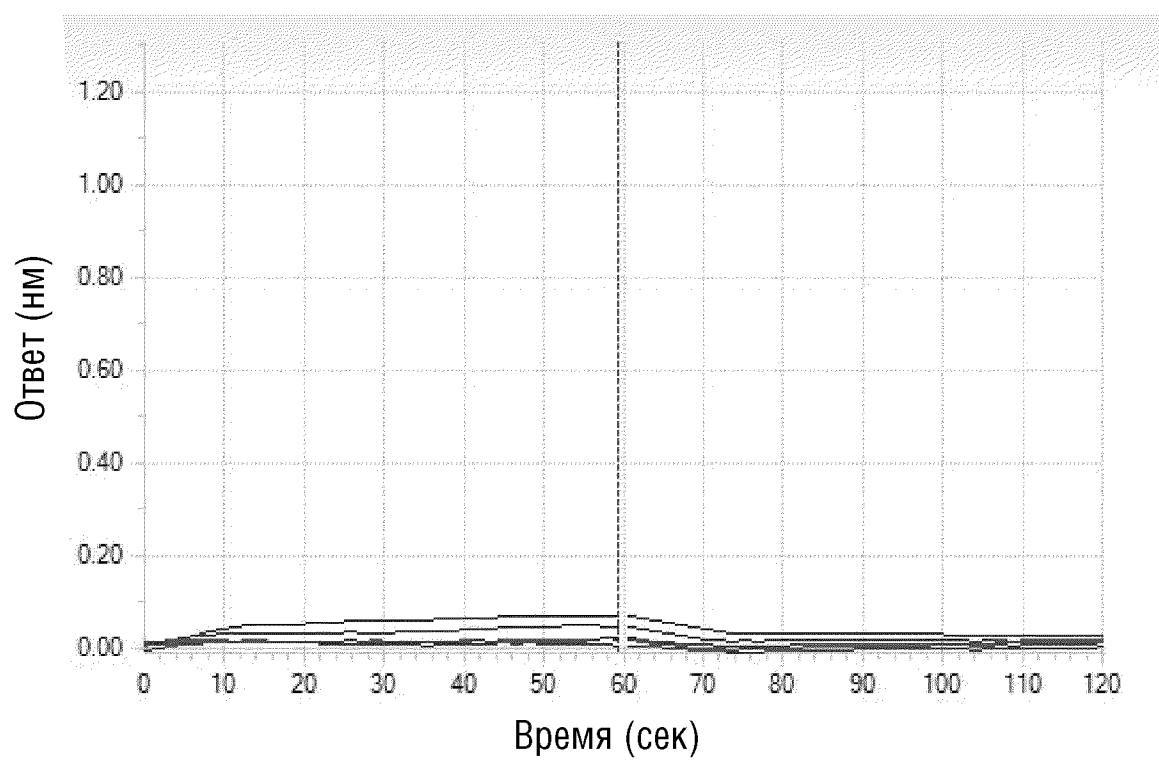
ФИГ.5



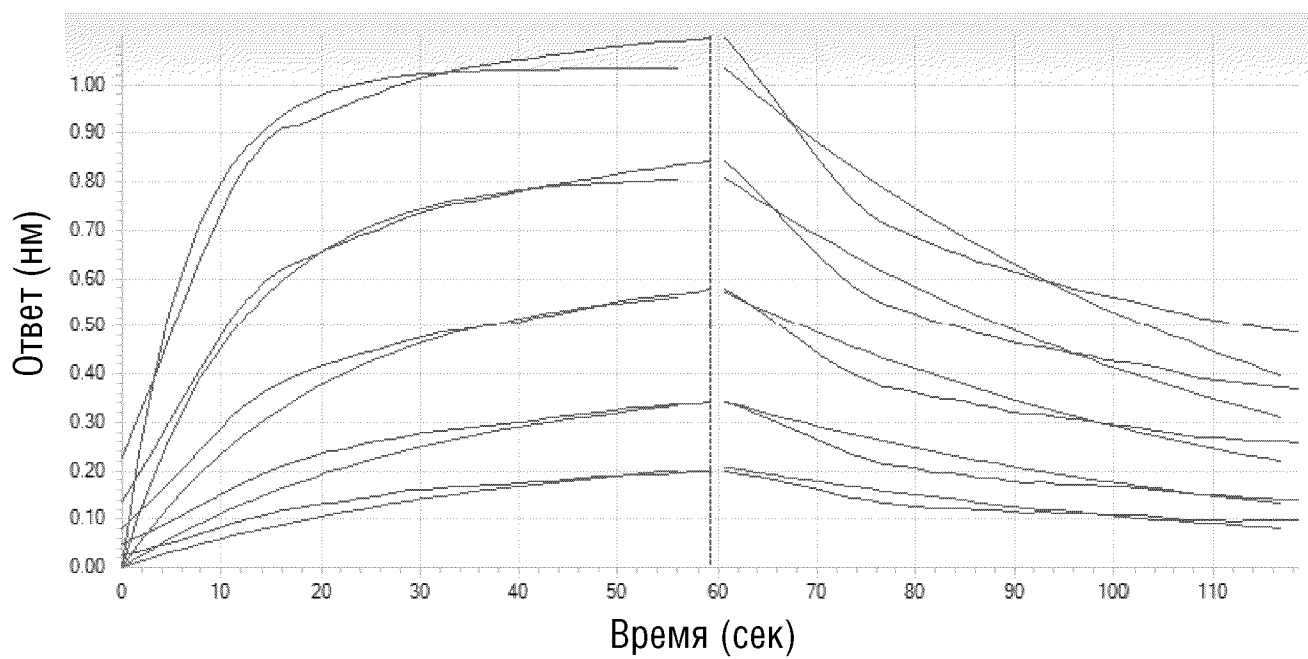
ФИГ.6



ФИГ.7

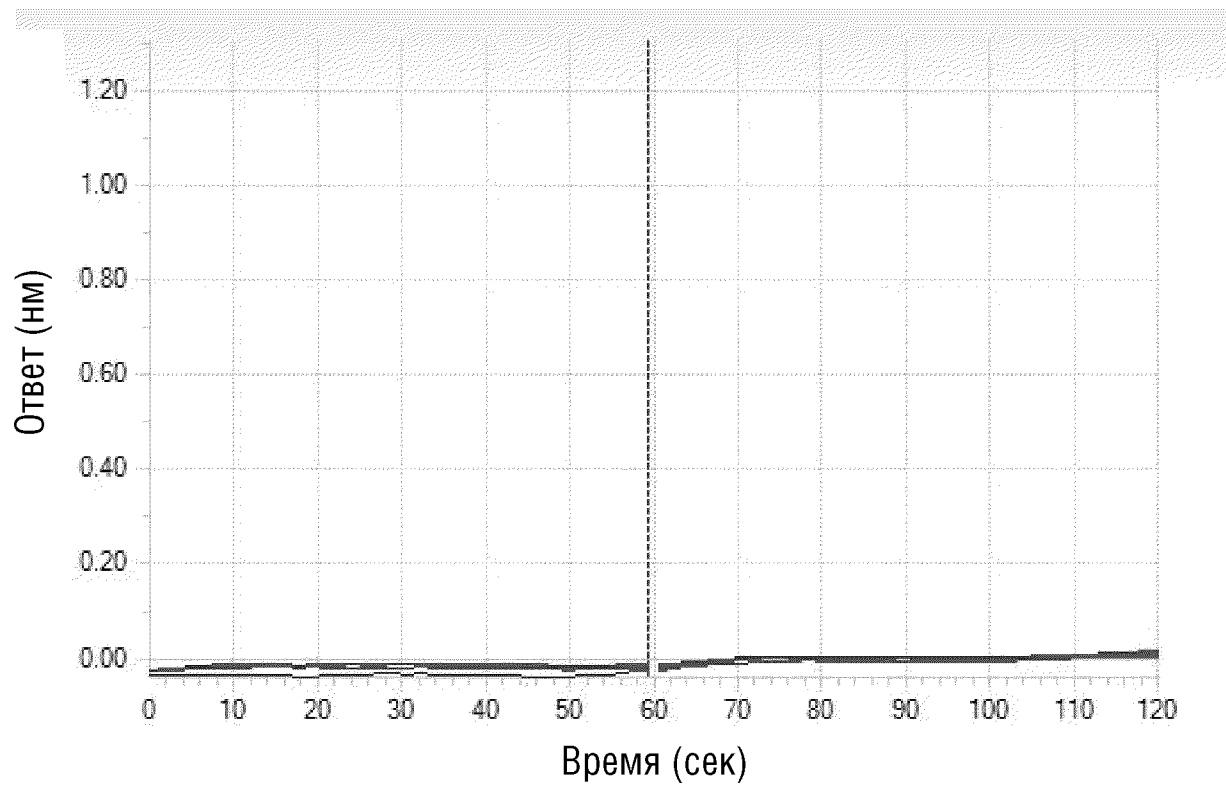


ФИГ.8

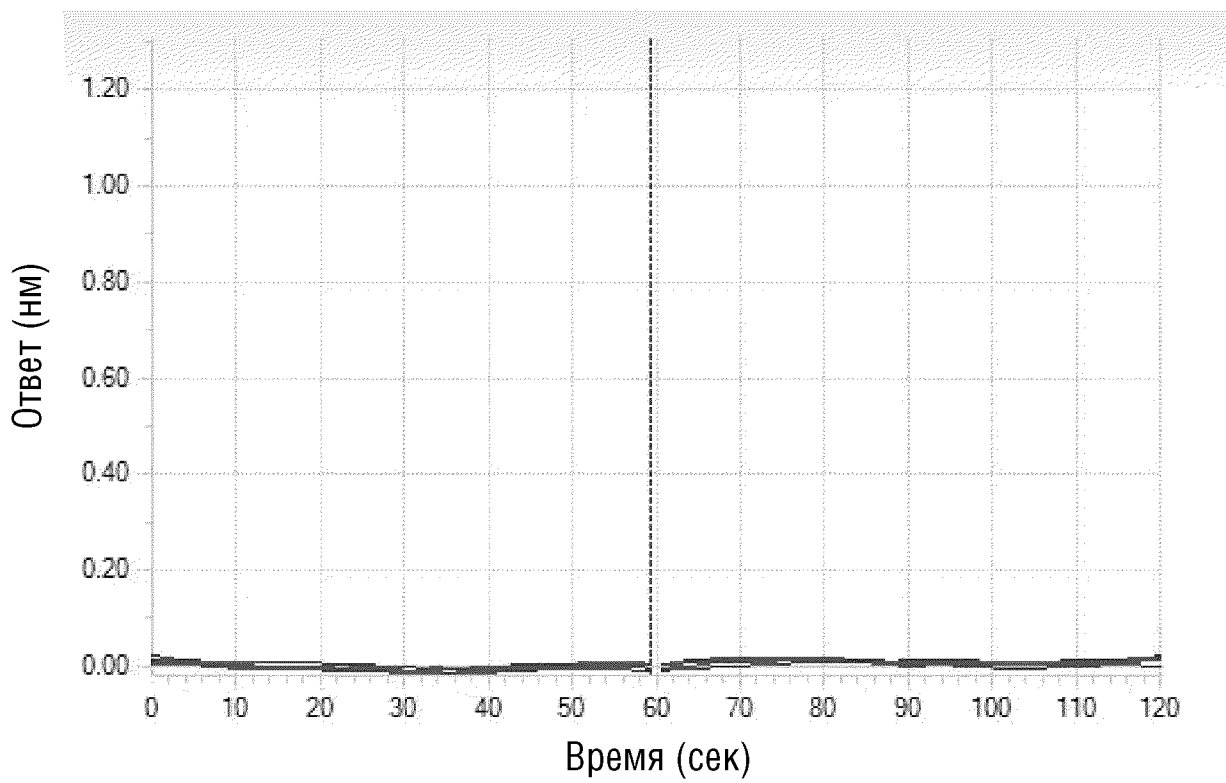


5/24

ФИГ.9

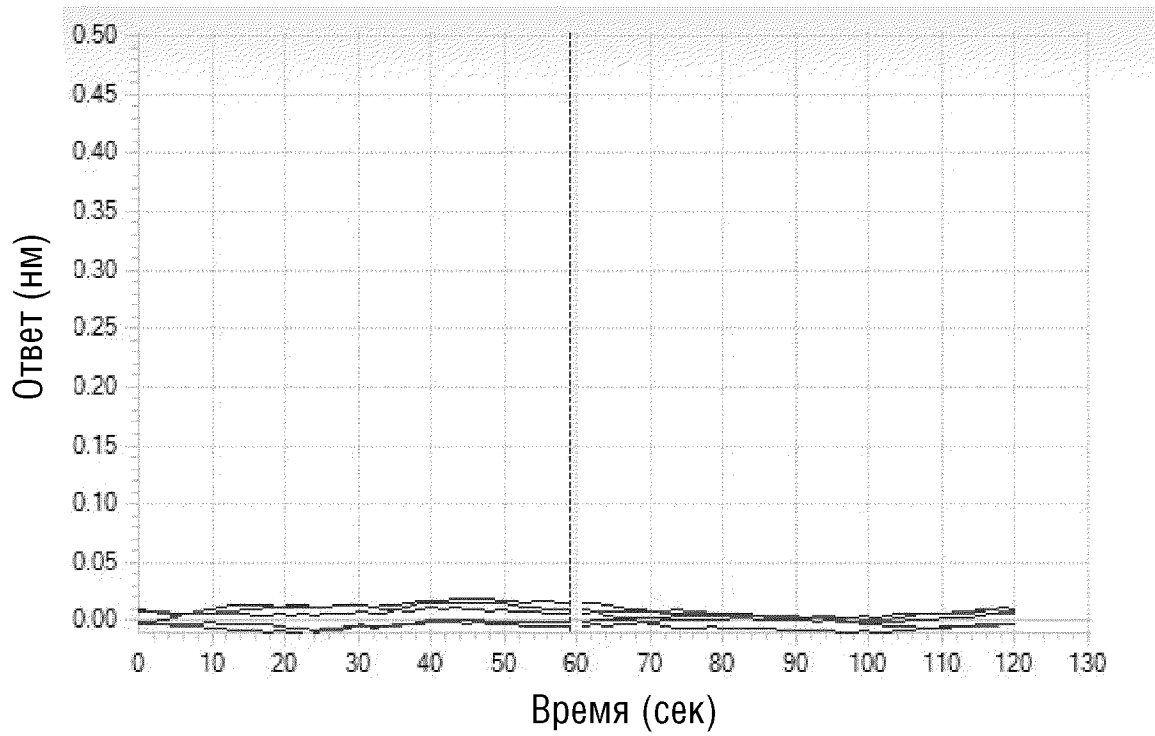


ФИГ.10

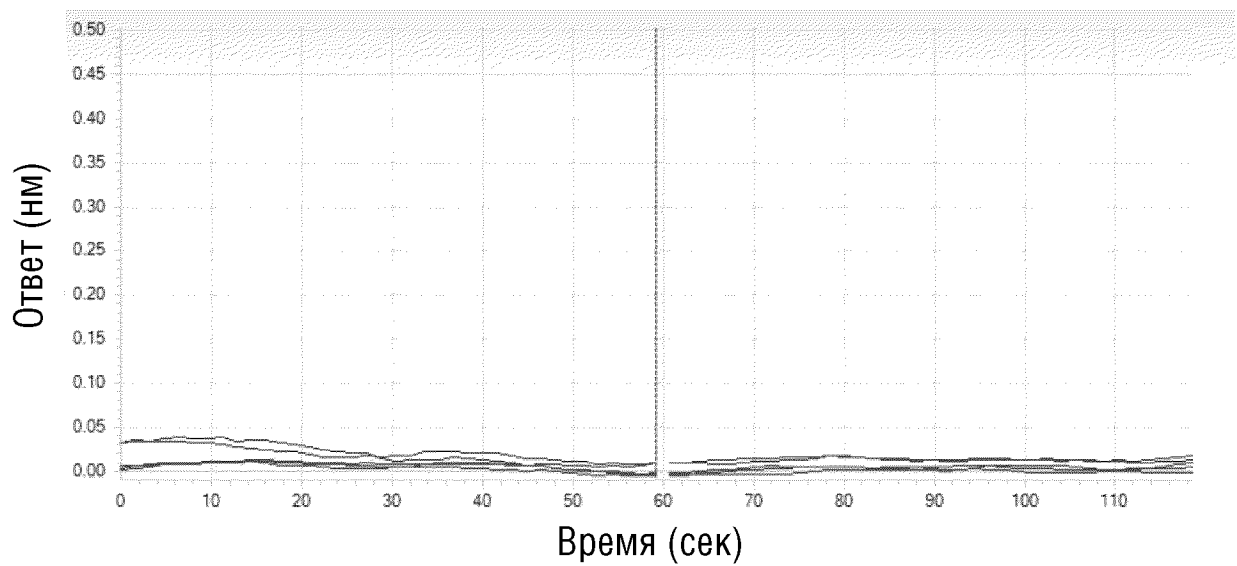


6/24

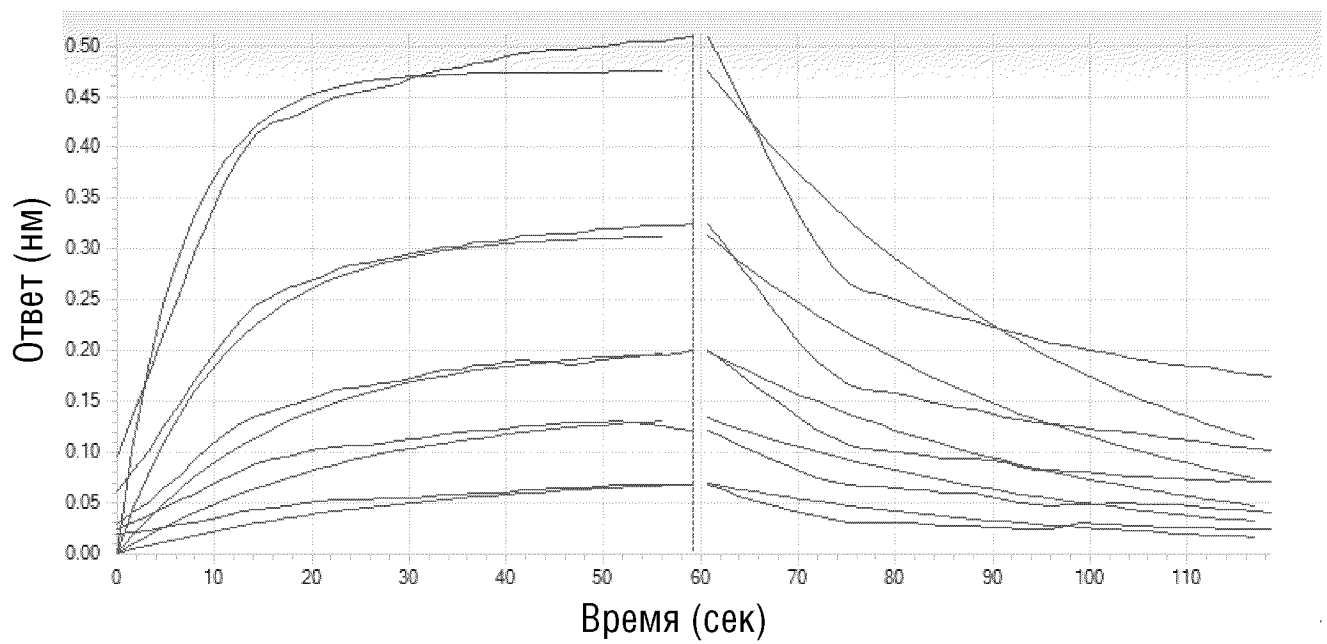
ФИГ.11



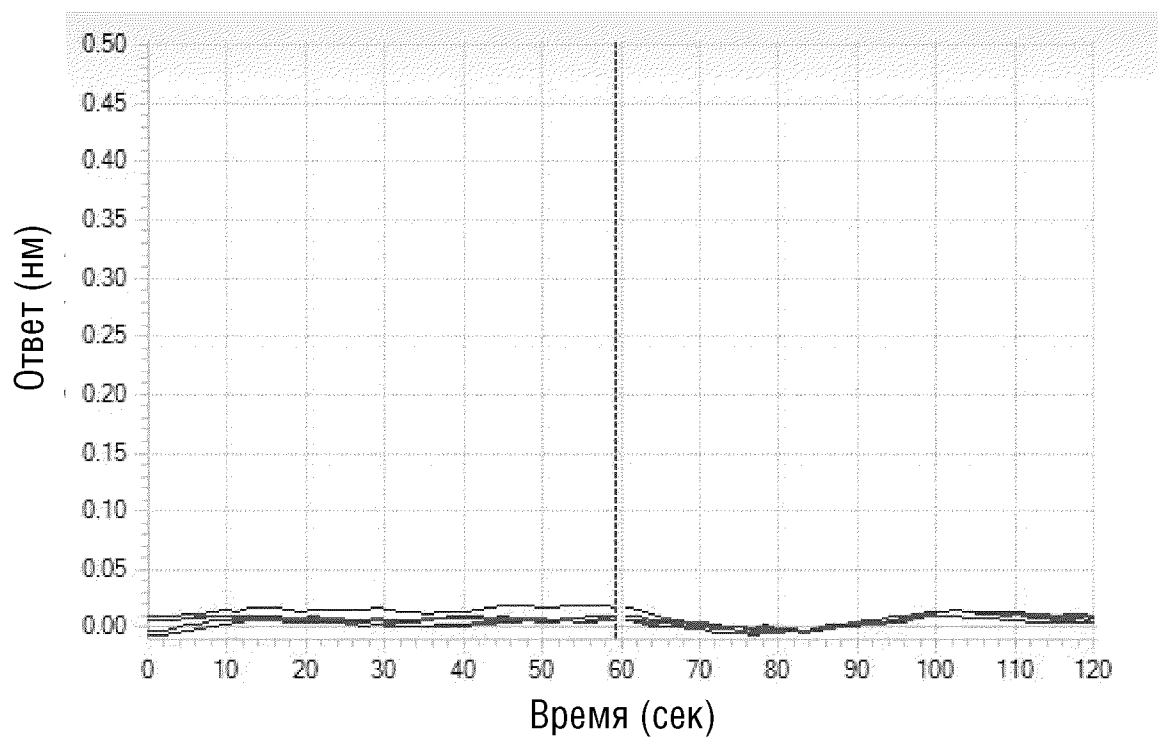
ФИГ.12



ФИГ.13

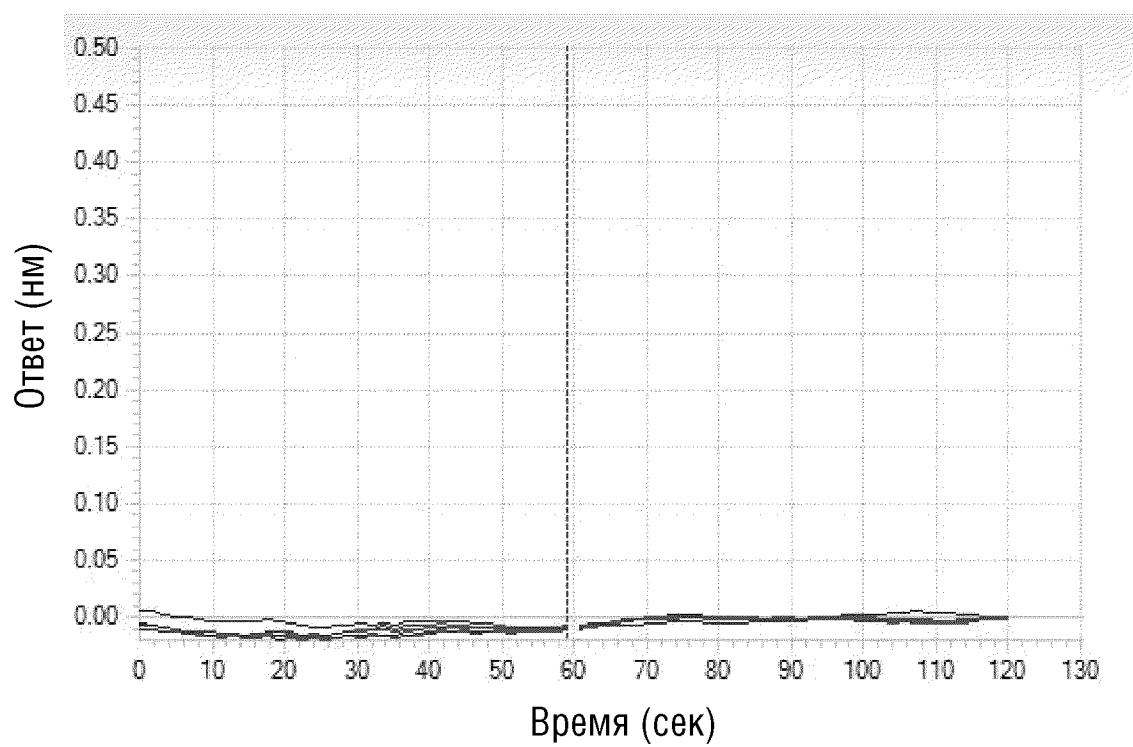


ФИГ.14

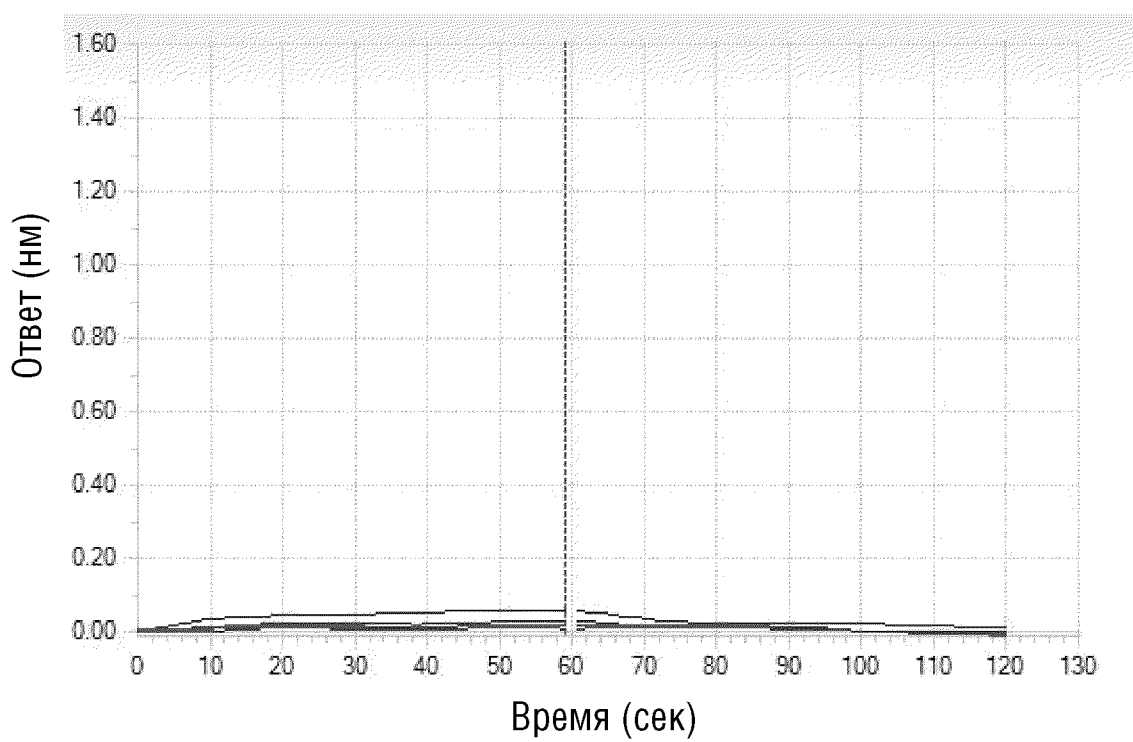


8/24

ФИГ.15

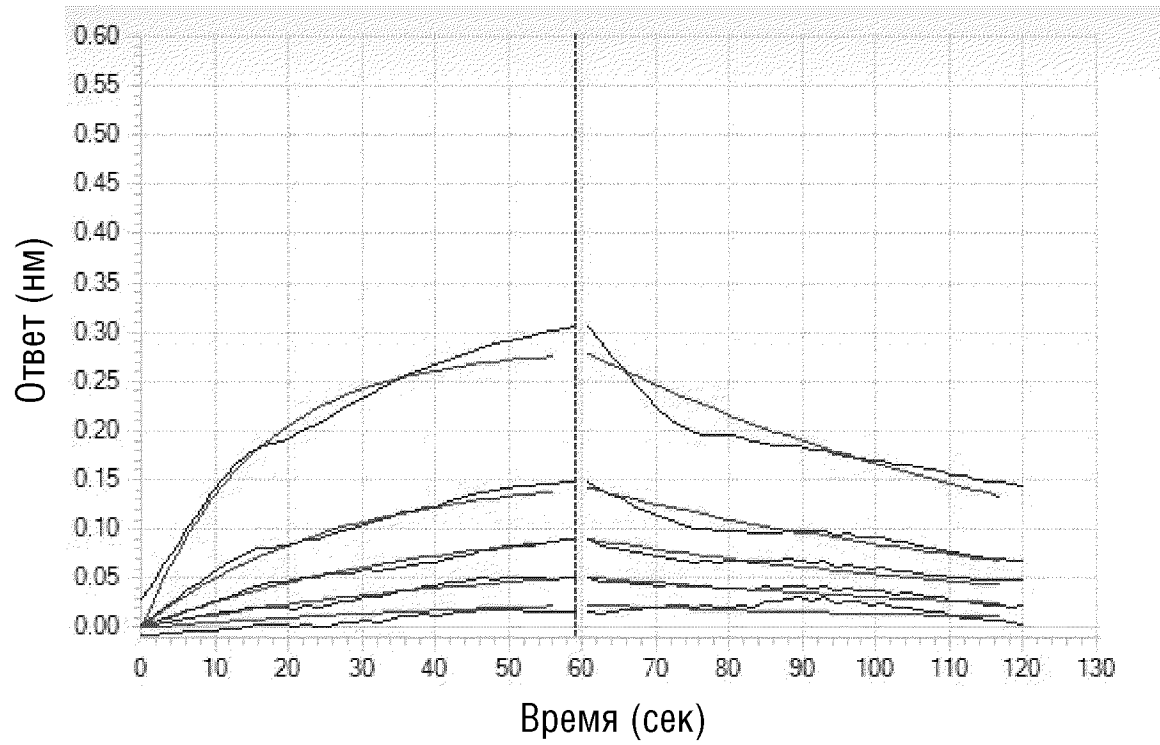


ФИГ.16

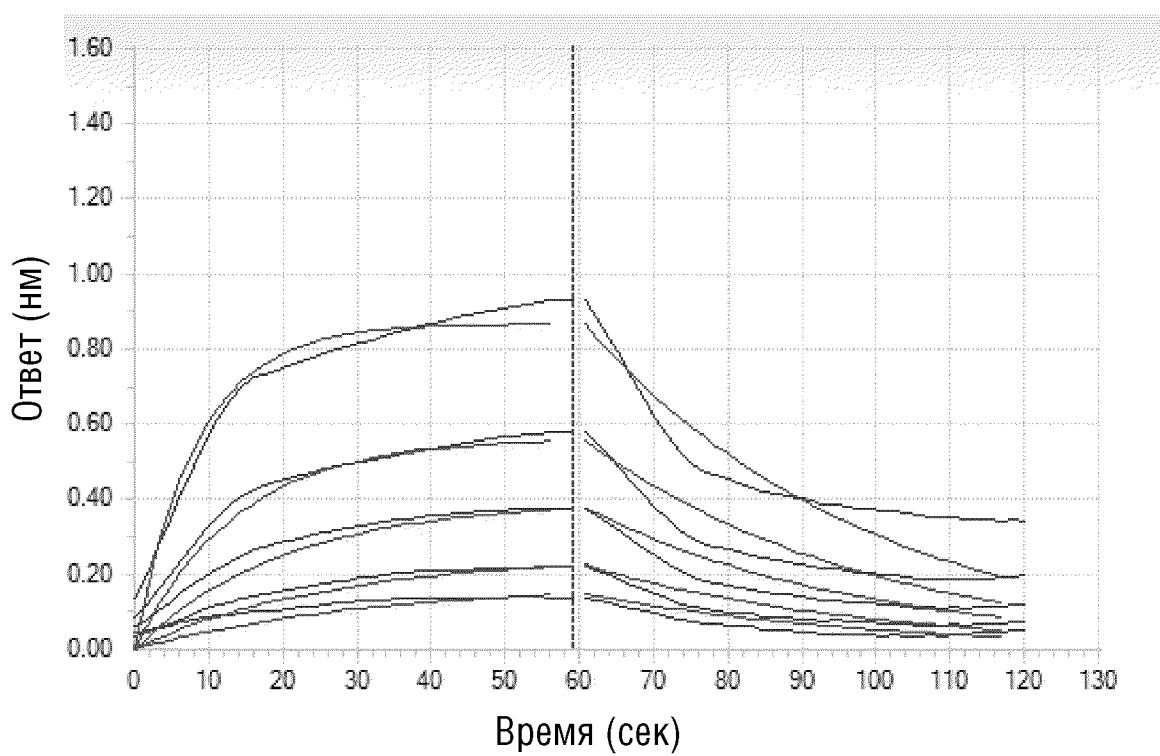


9/24

ФИГ.17

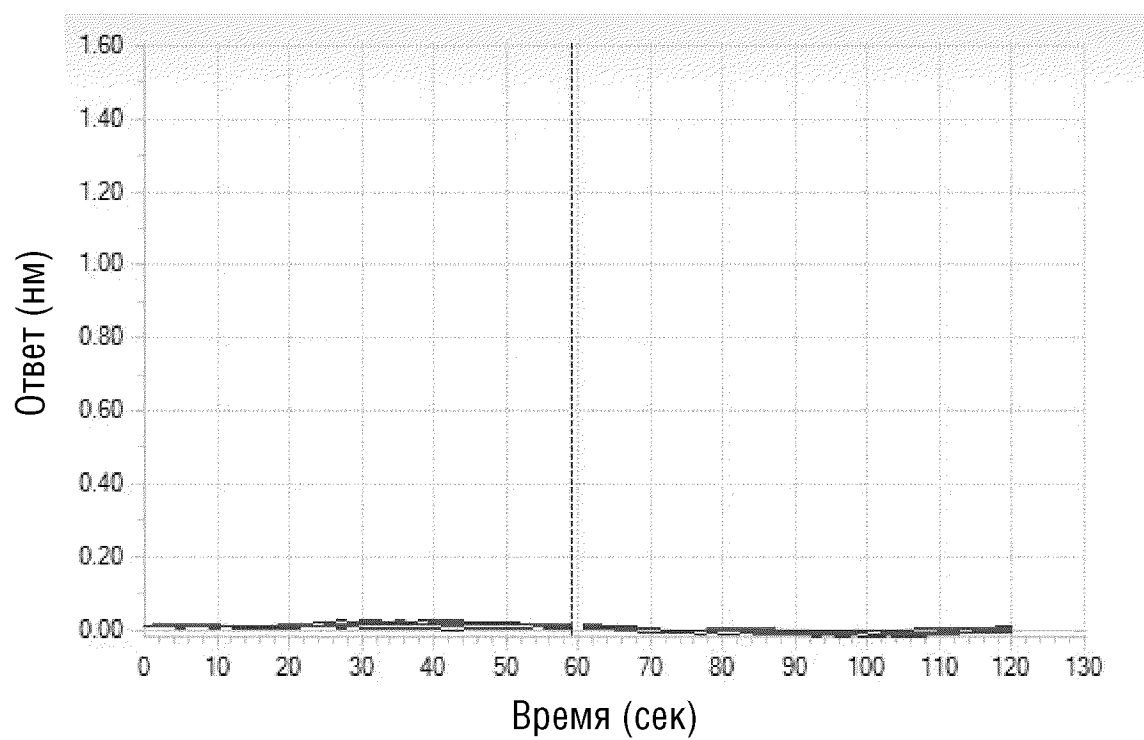


ФИГ.18

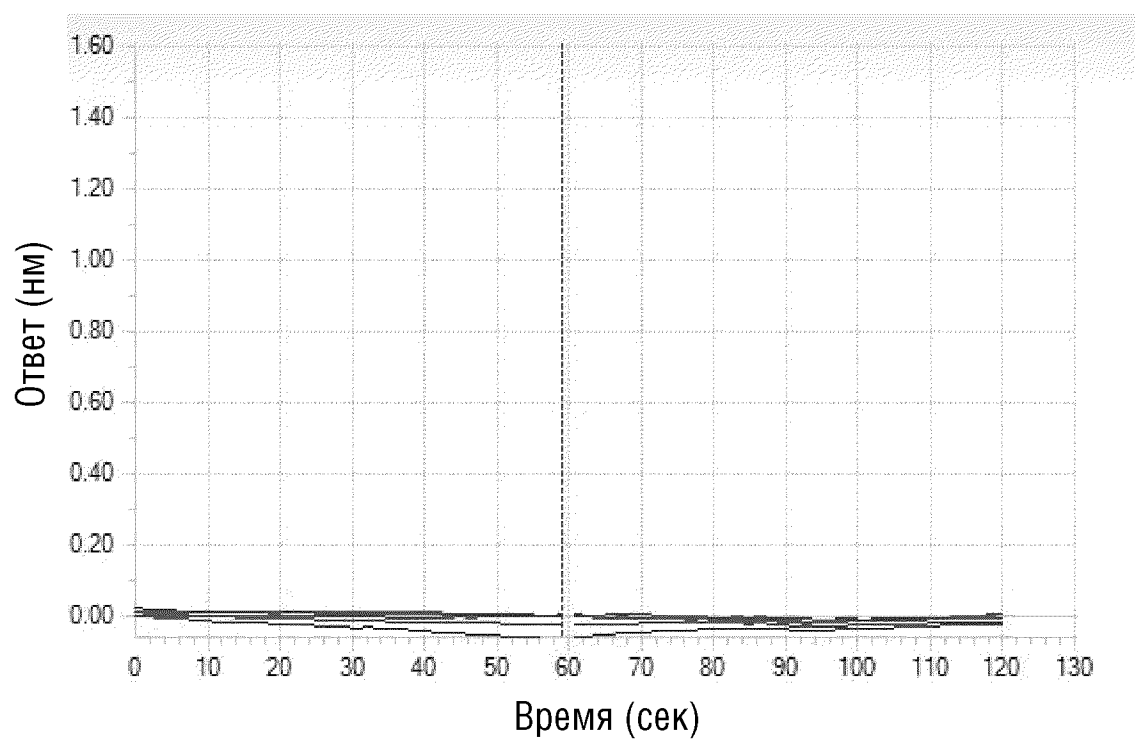


10/24

ФИГ.19

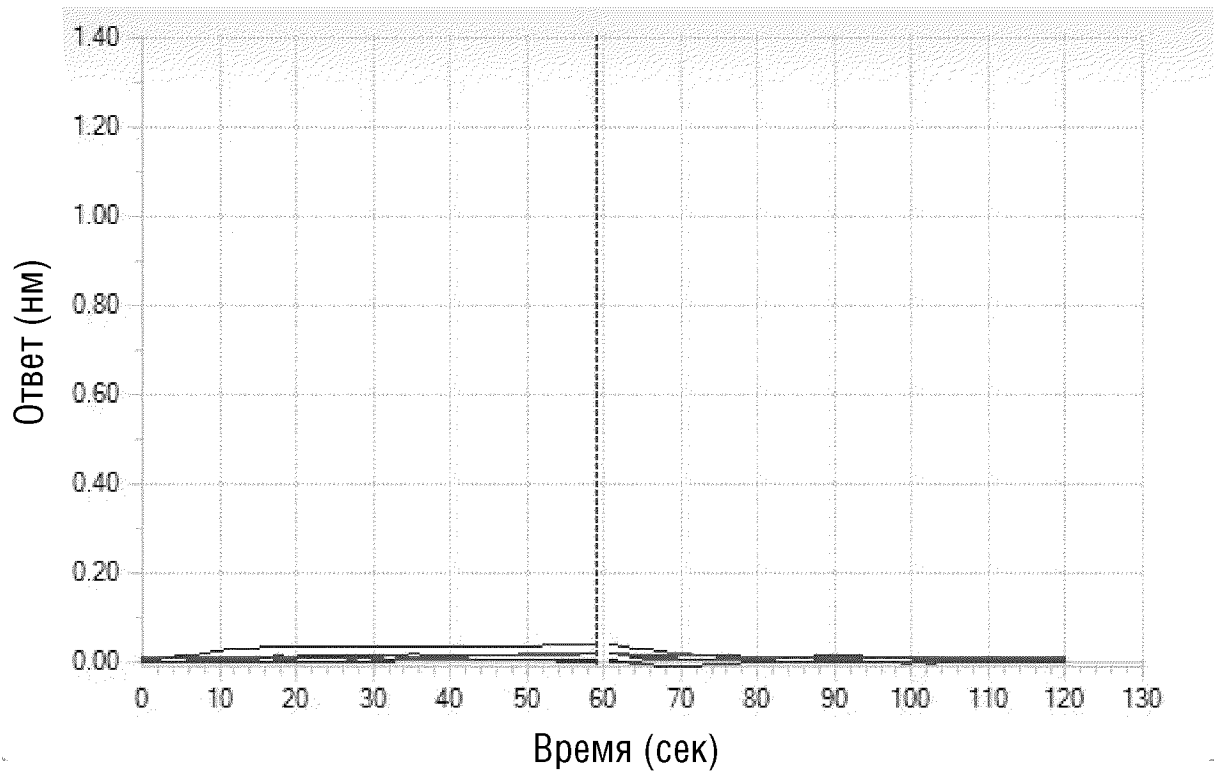


ФИГ.20

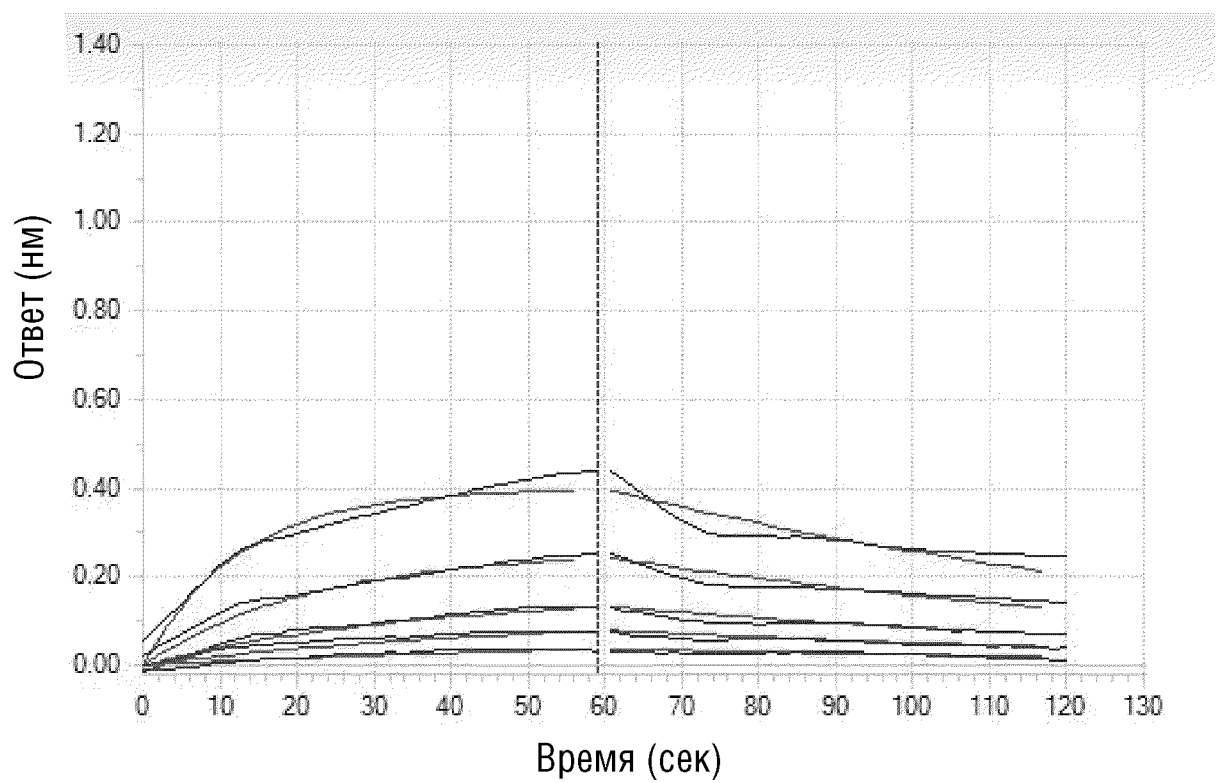


11/24

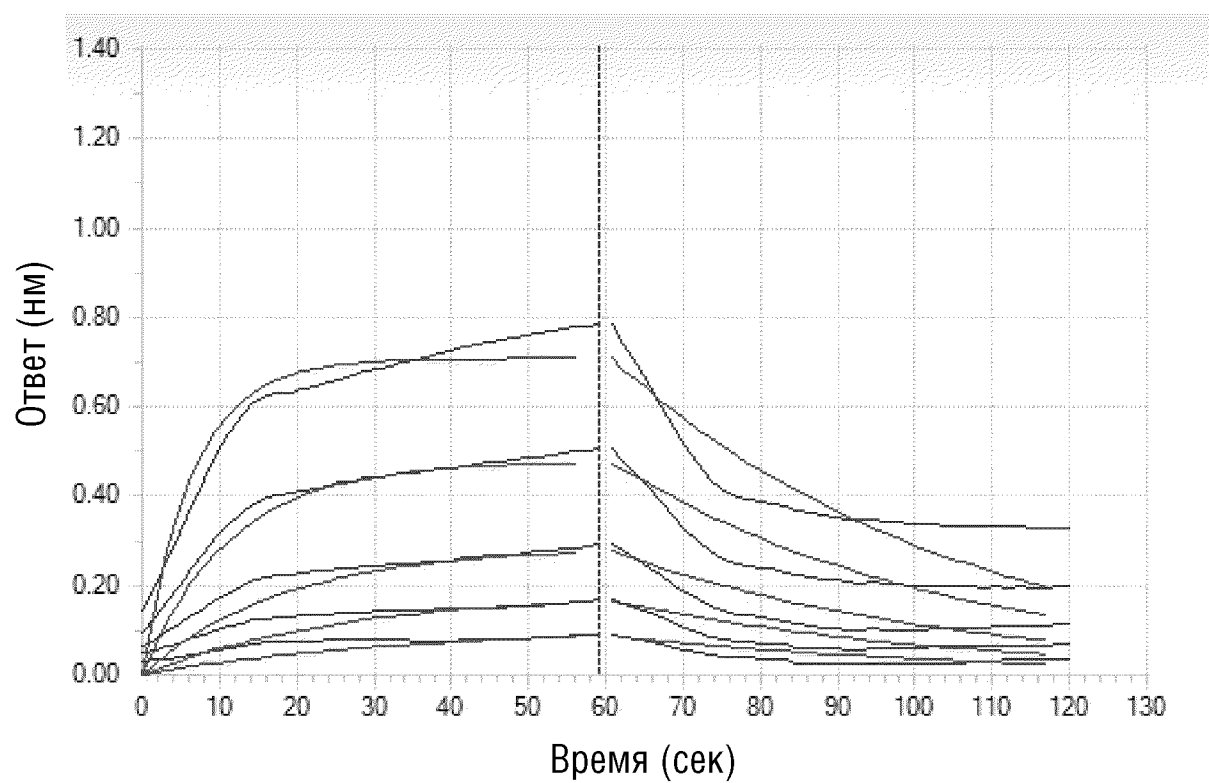
ФИГ.22



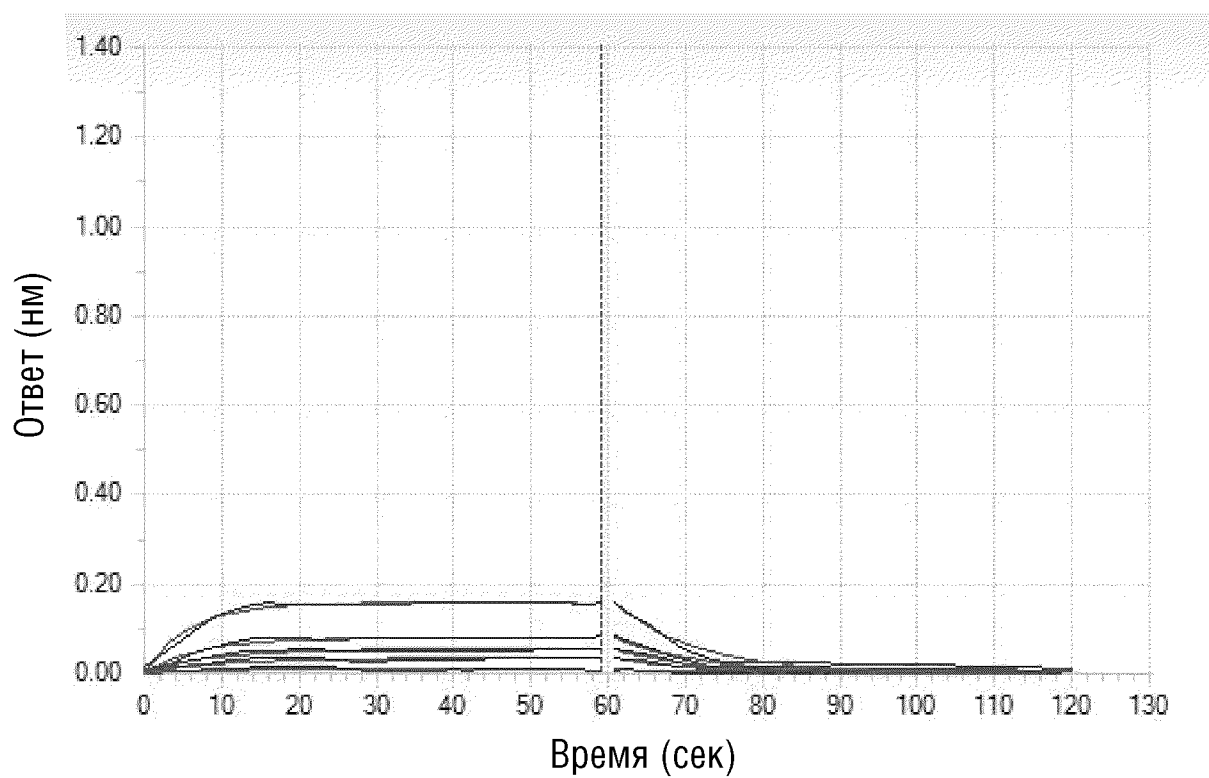
ФИГ.21



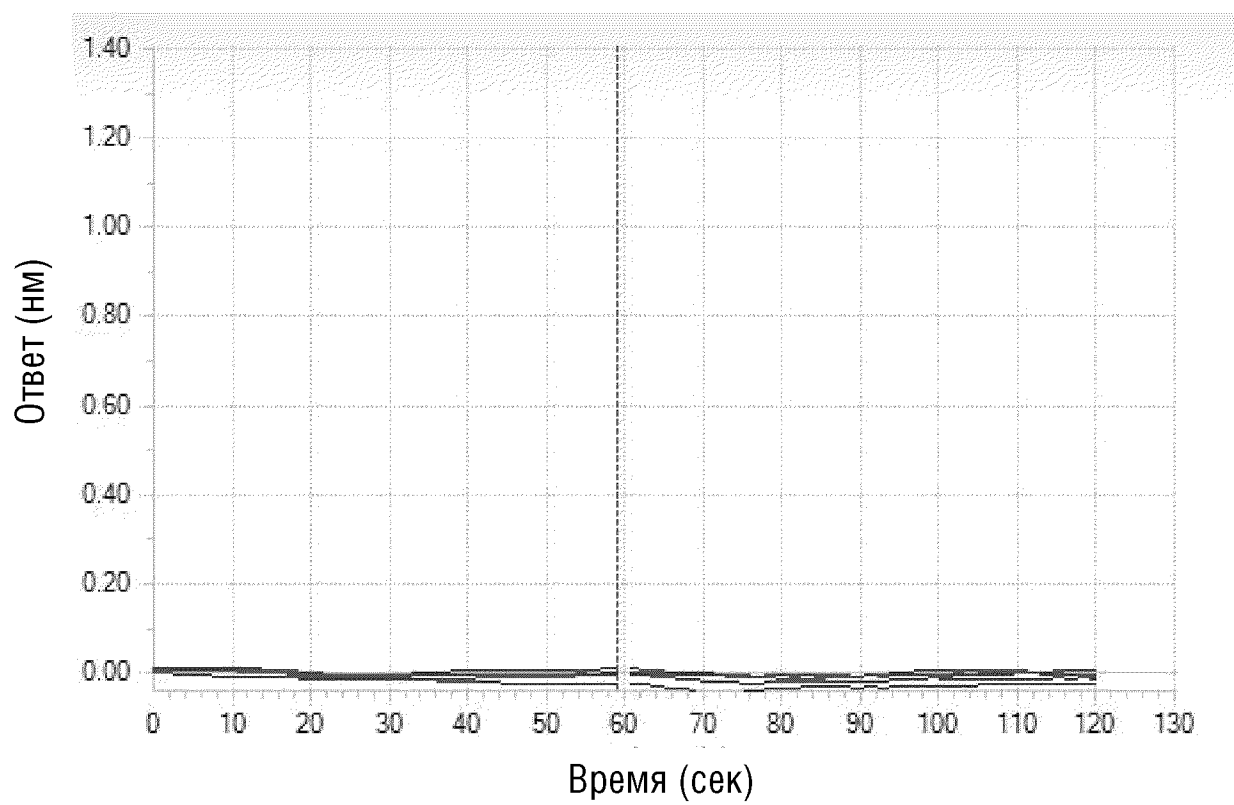
ФИГ.23



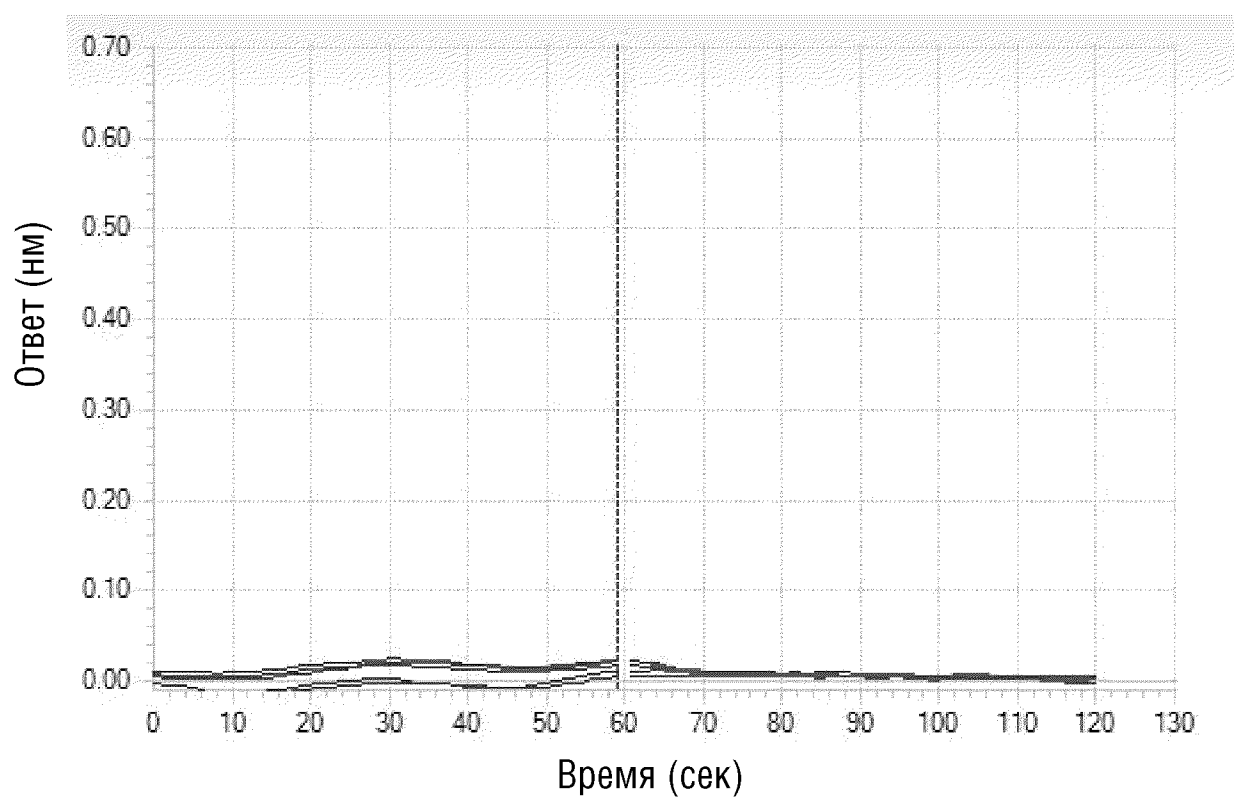
ФИГ.24



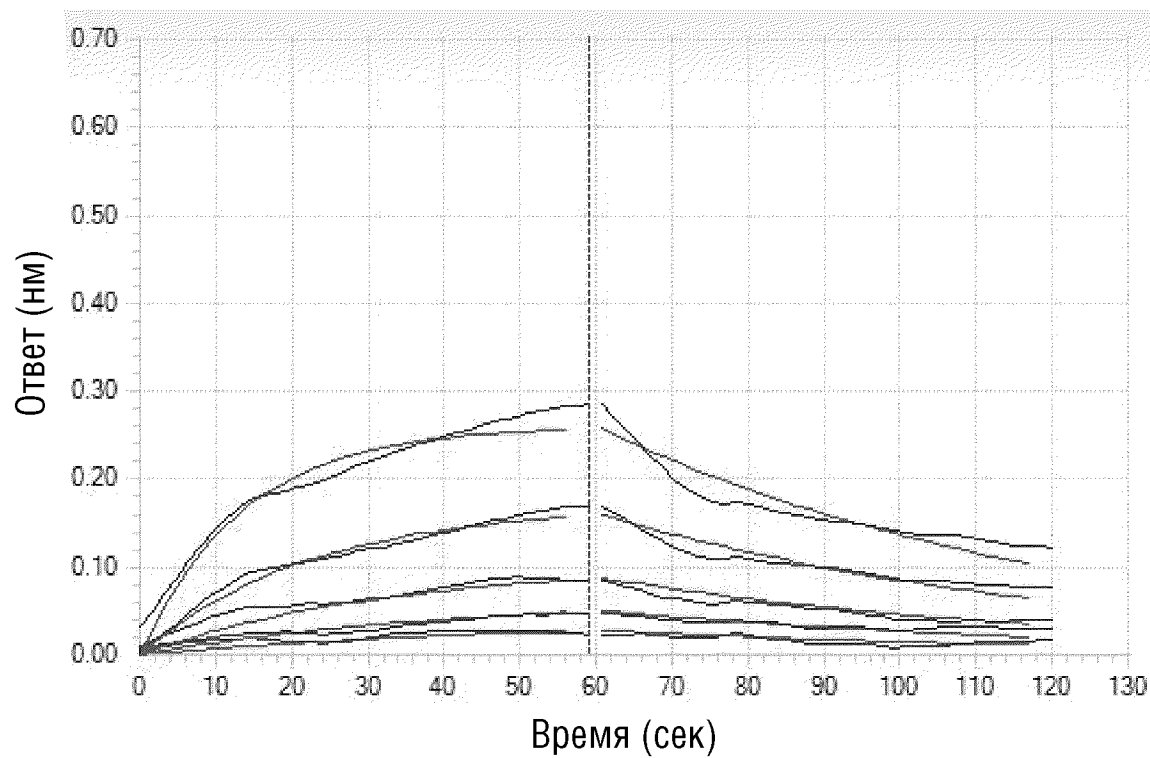
ФИГ.25



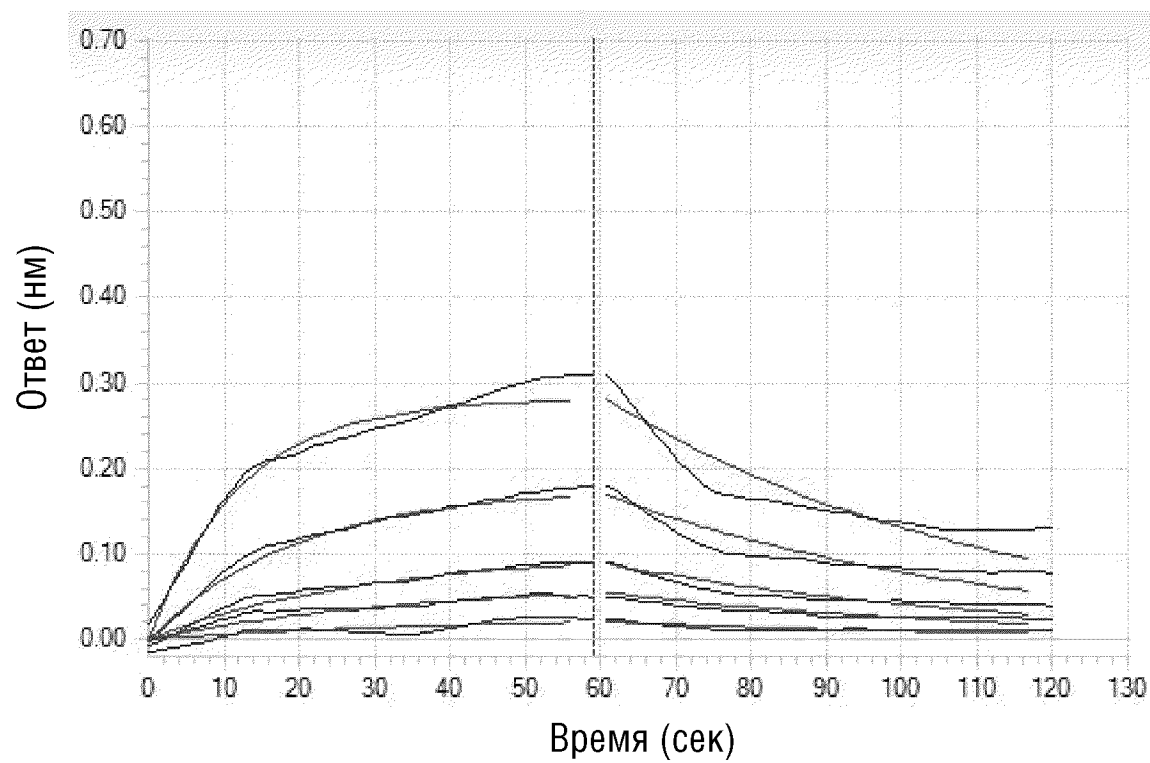
ФИГ.26



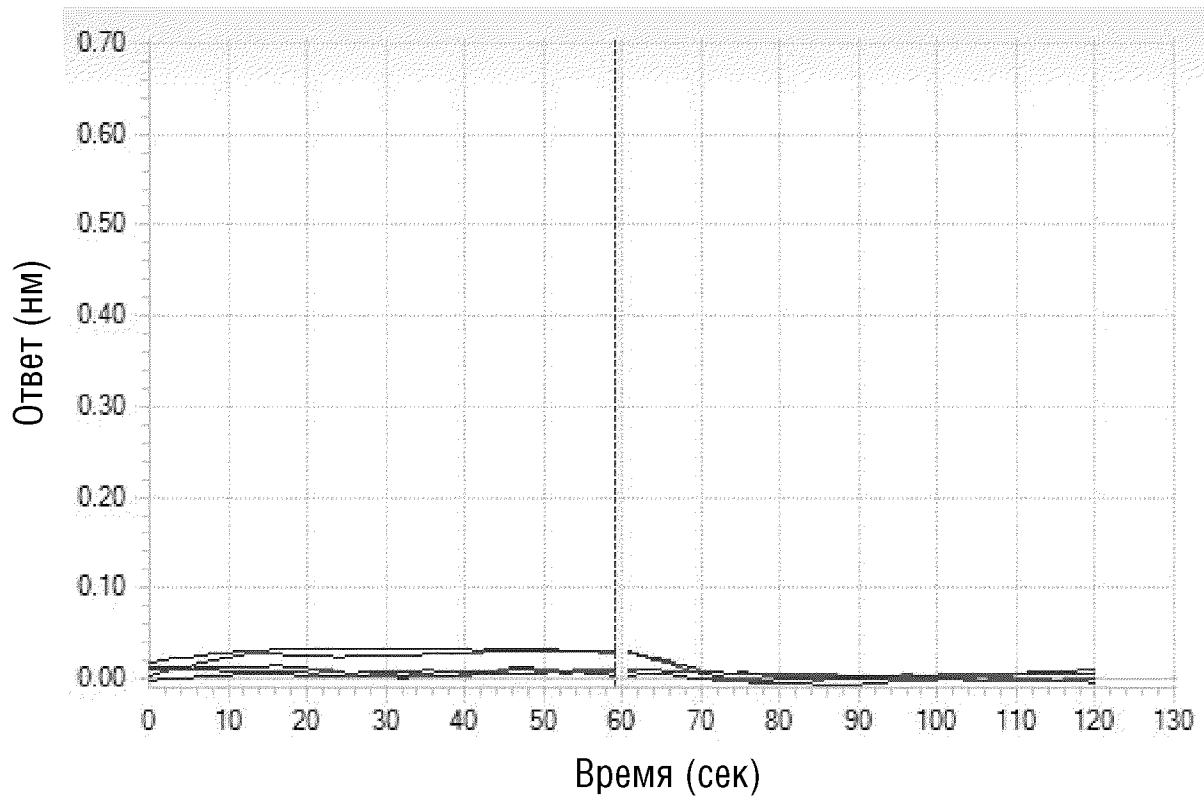
ФИГ.27



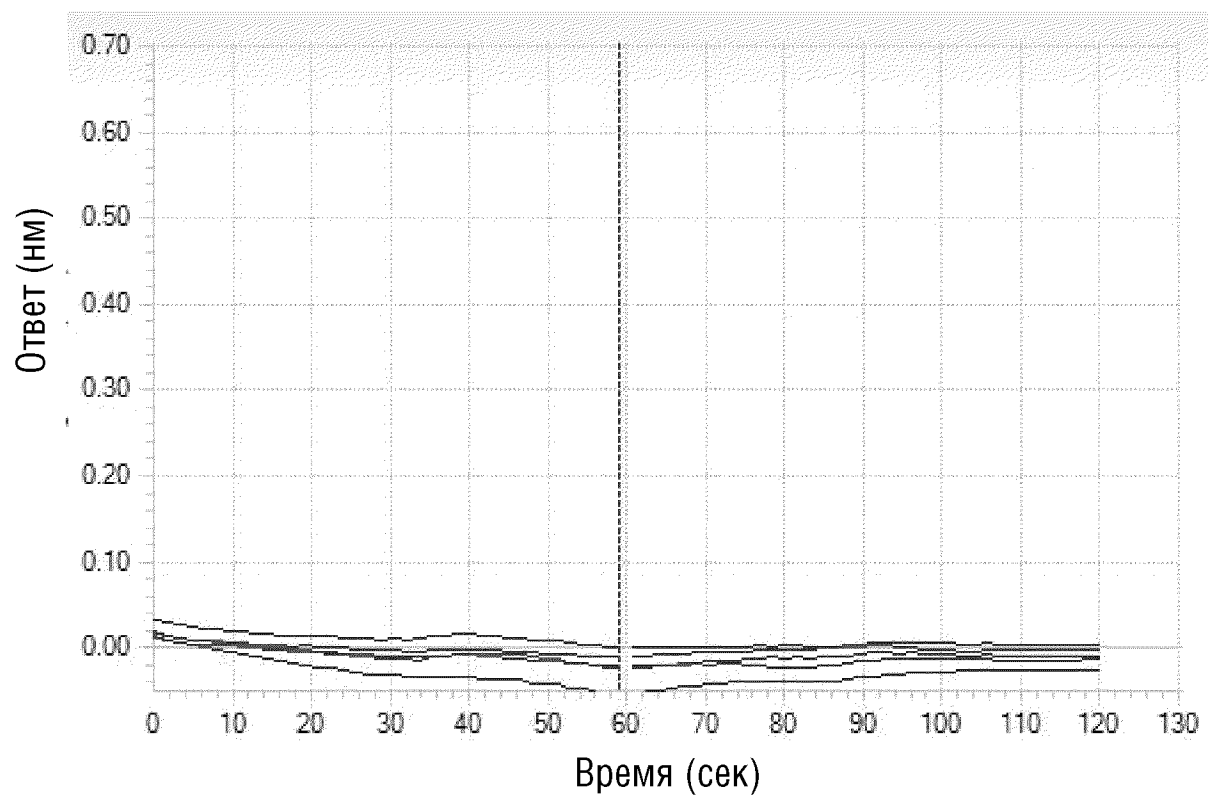
ФИГ.28



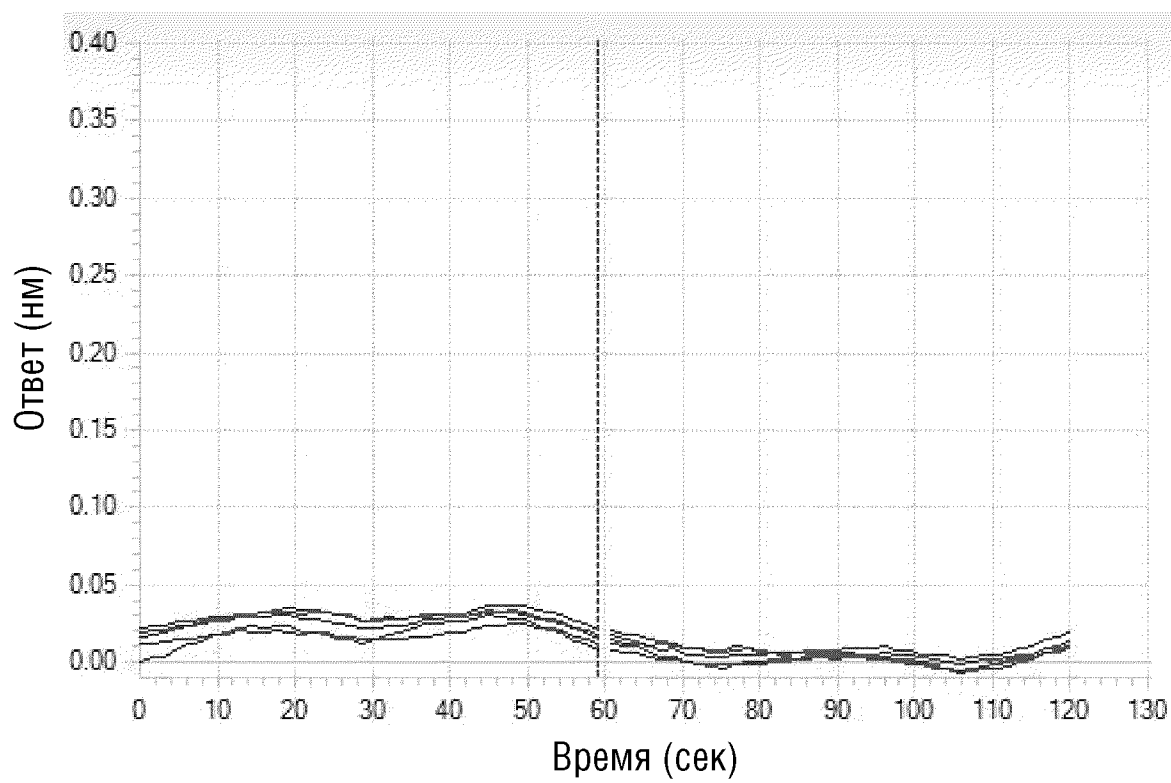
ФИГ.29



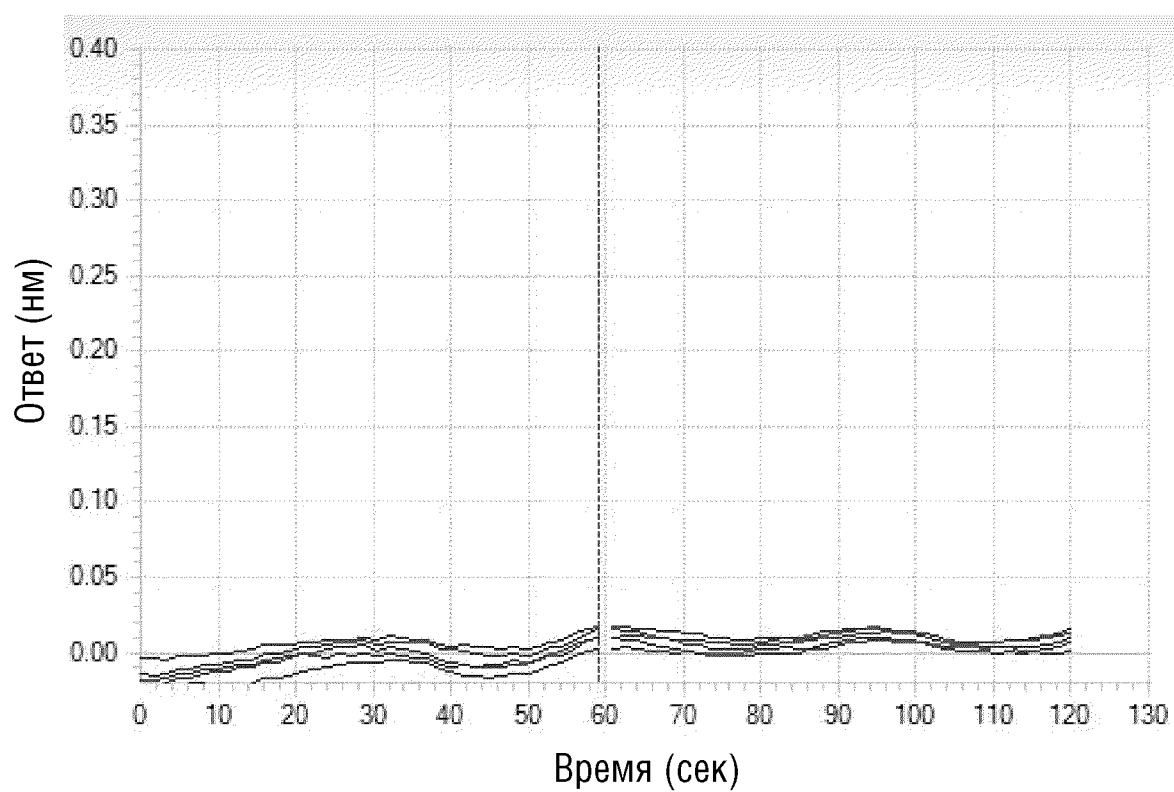
ФИГ.30



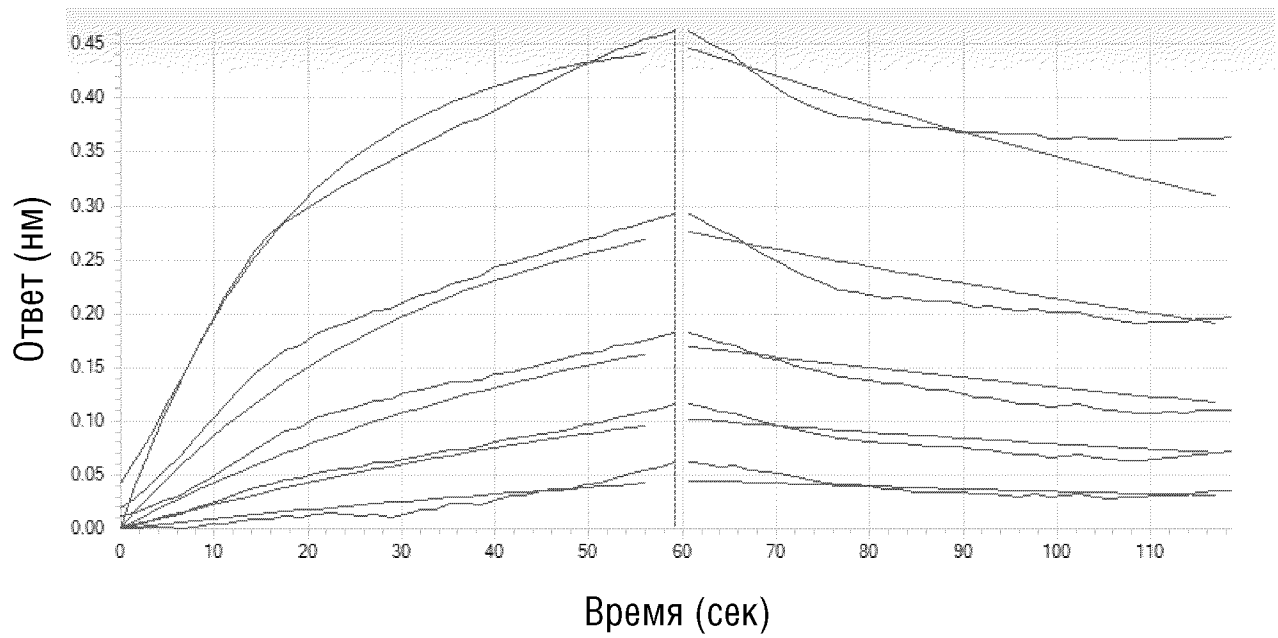
ФИГ.31



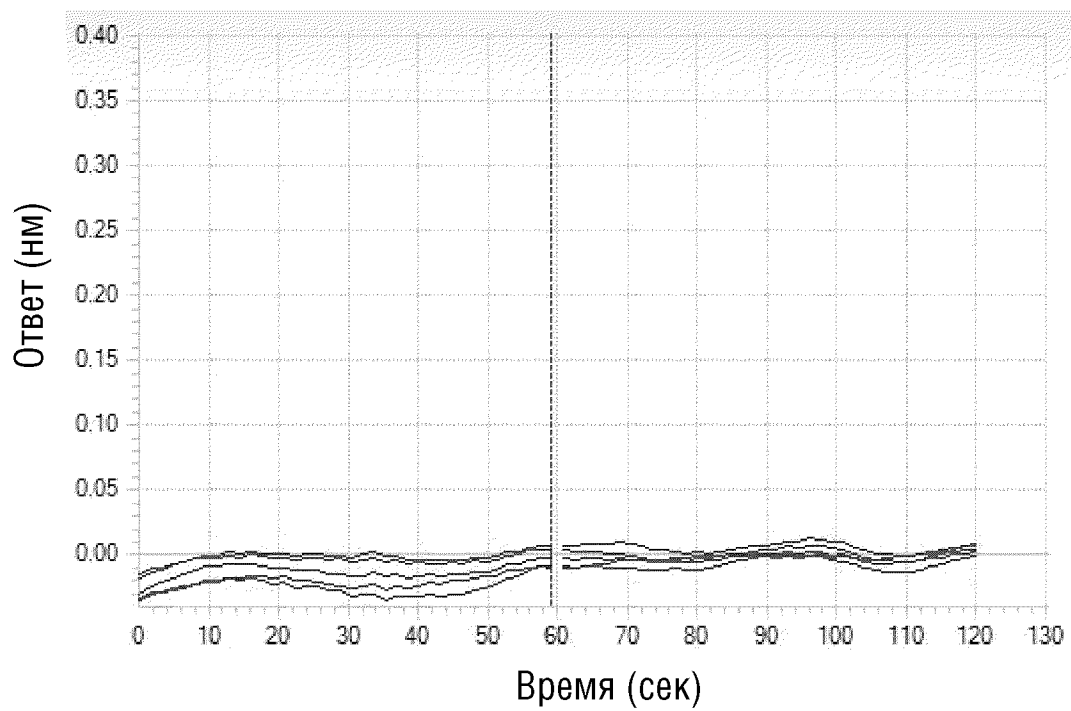
ФИГ.32



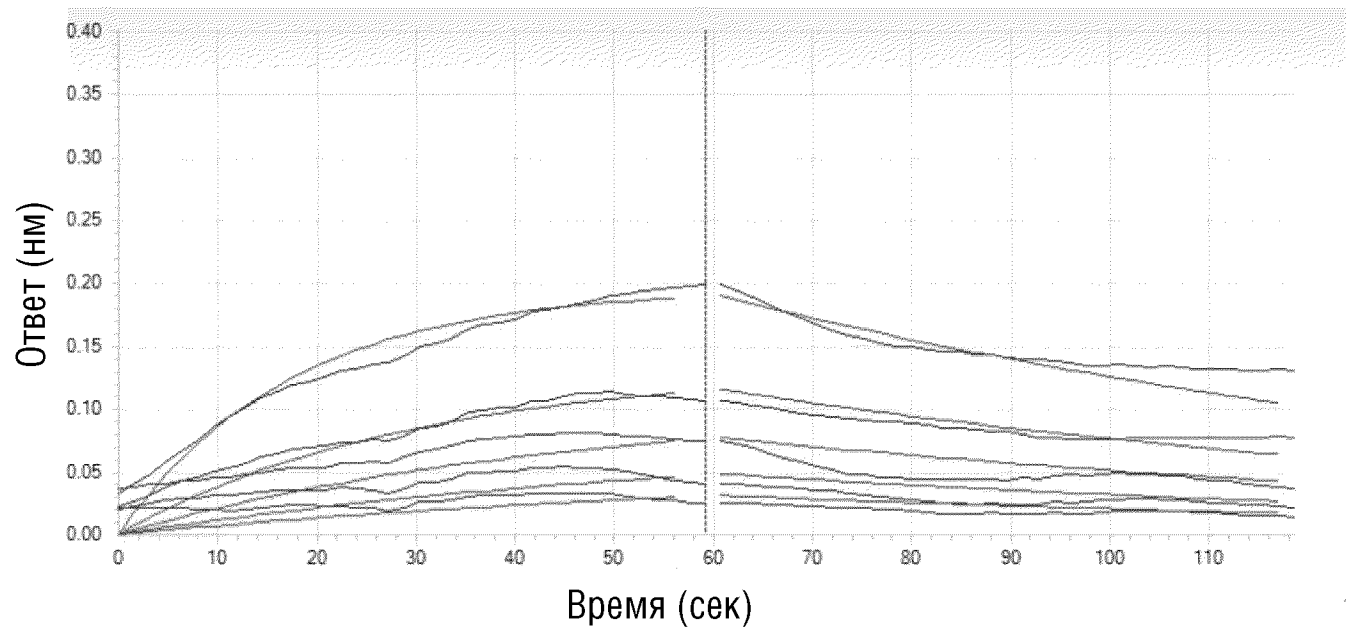
ФИГ.33



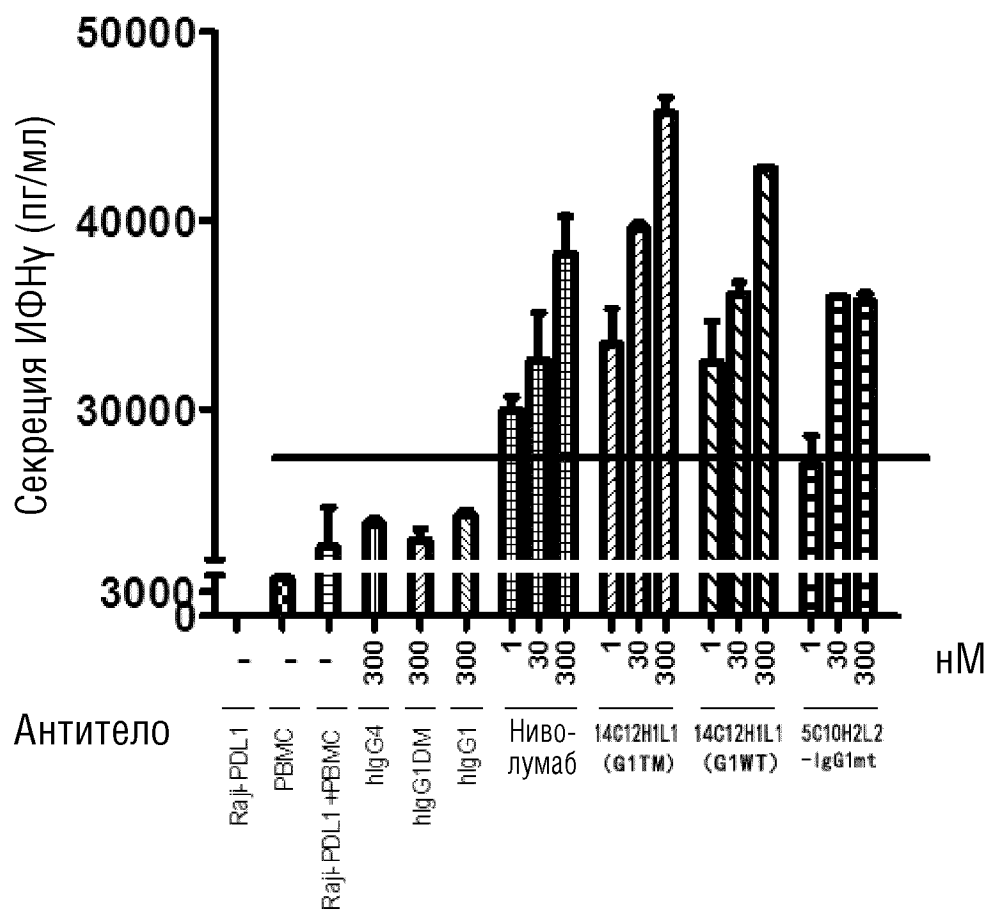
ФИГ.34



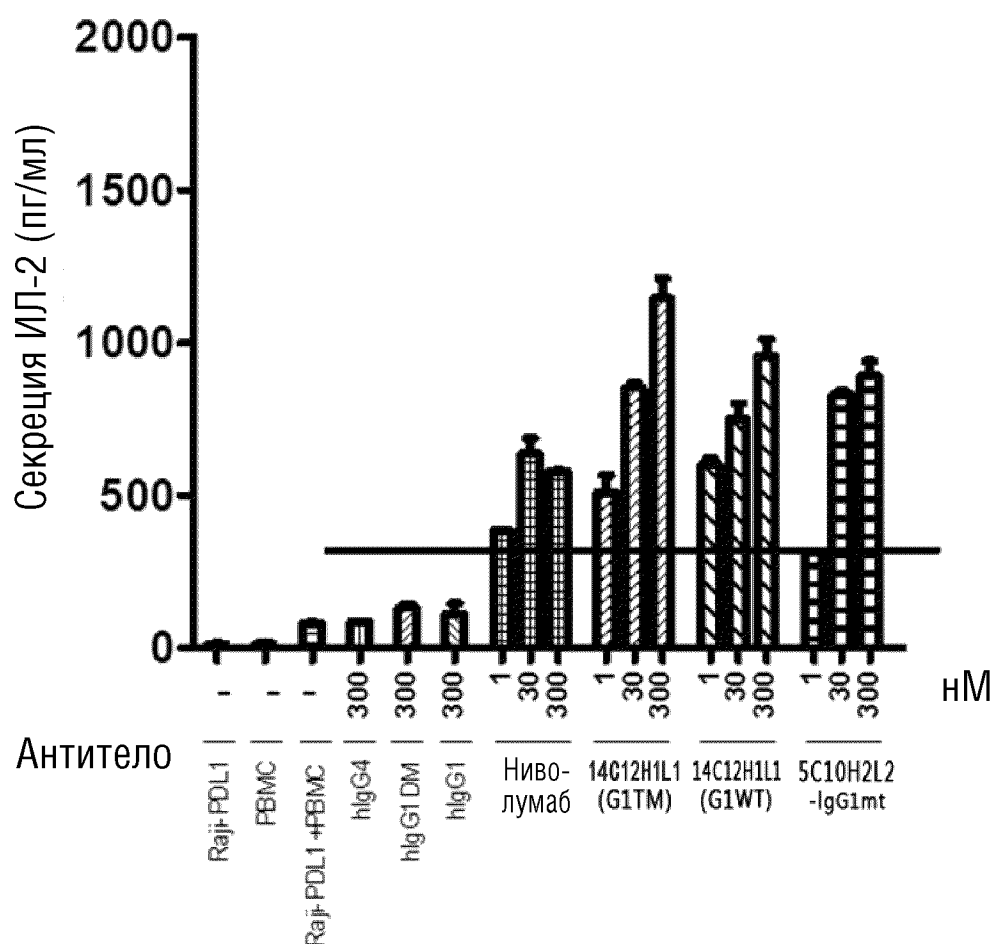
ФИГ.35



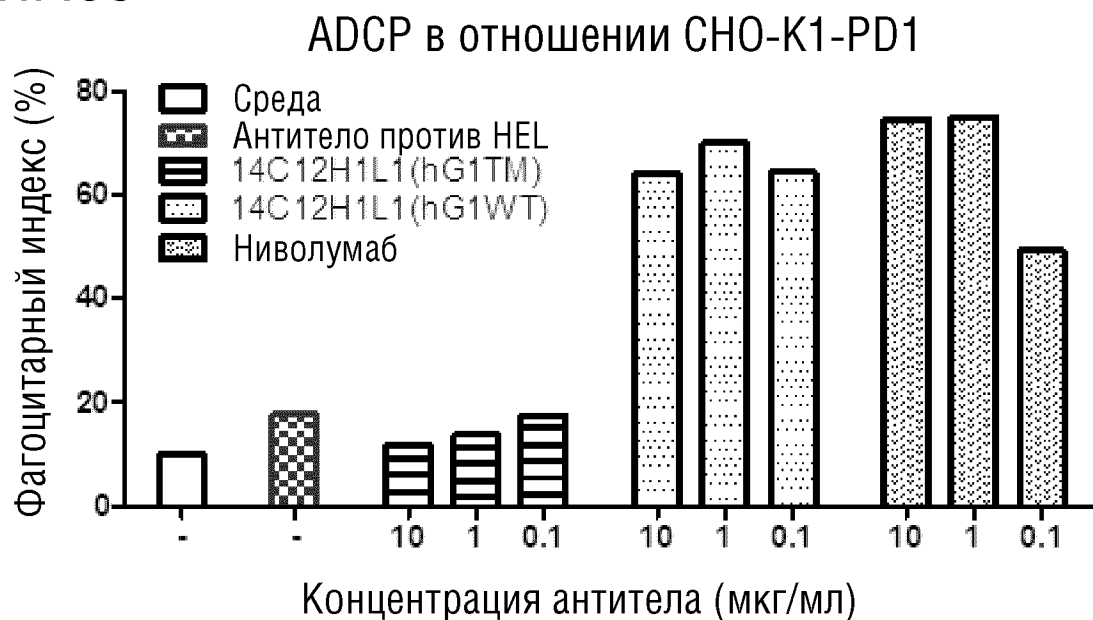
ФИГ.36



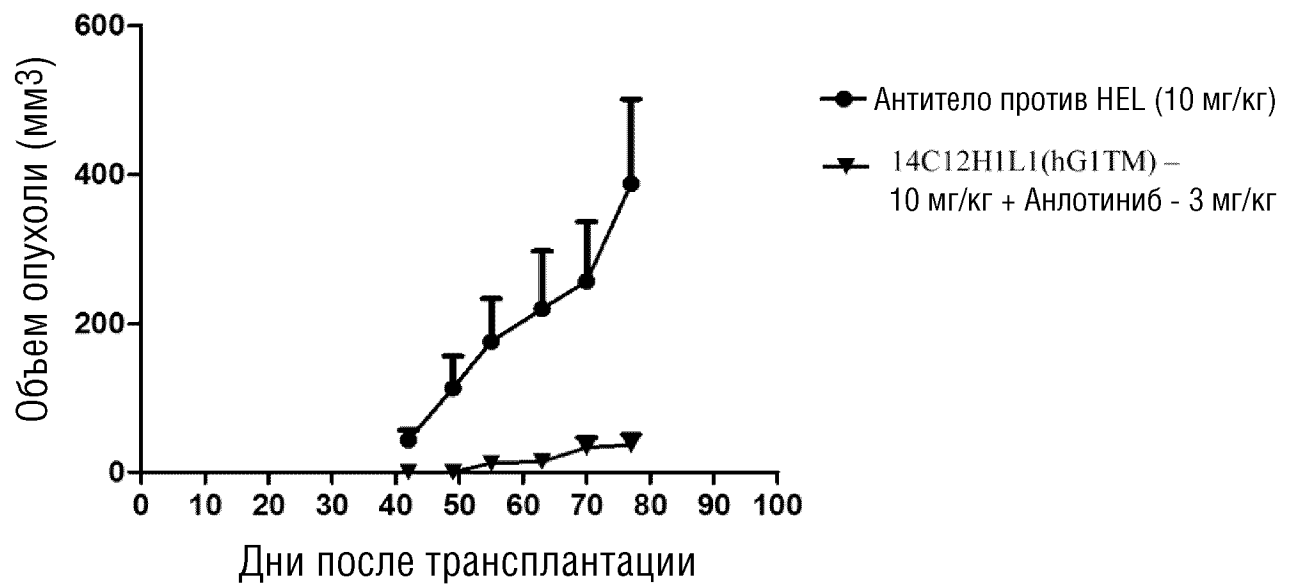
ФИГ.37



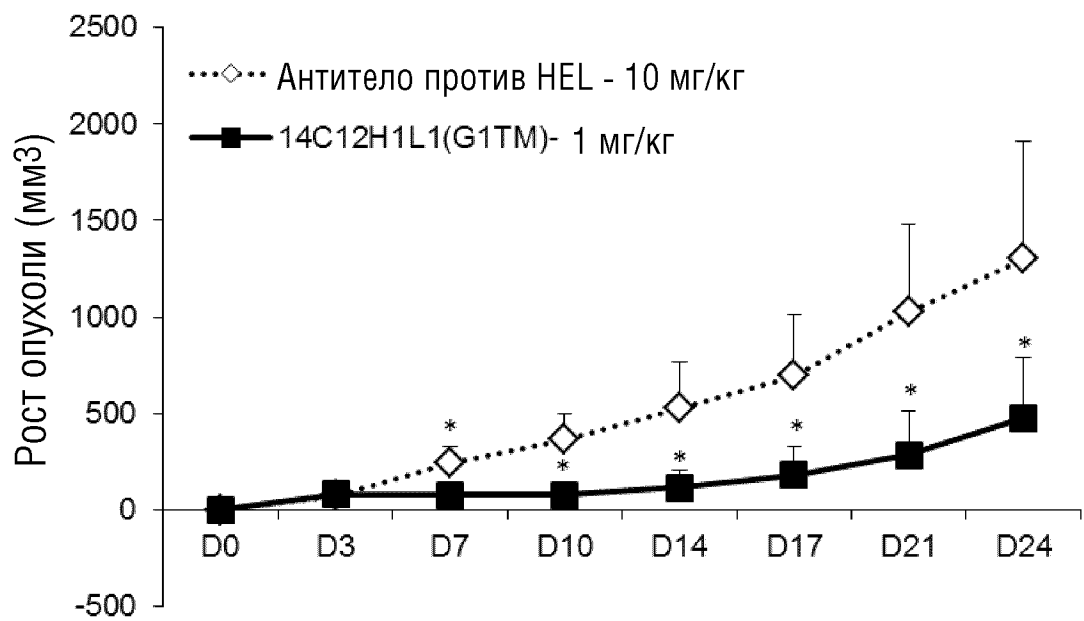
ФИГ.38



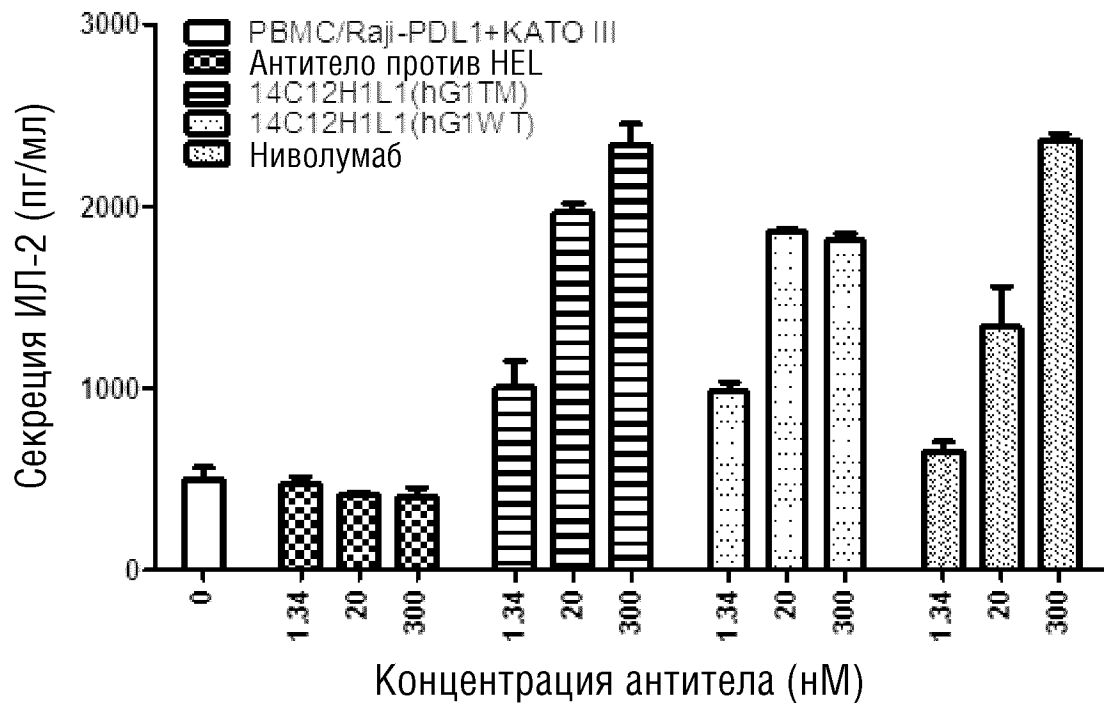
ФИГ.39



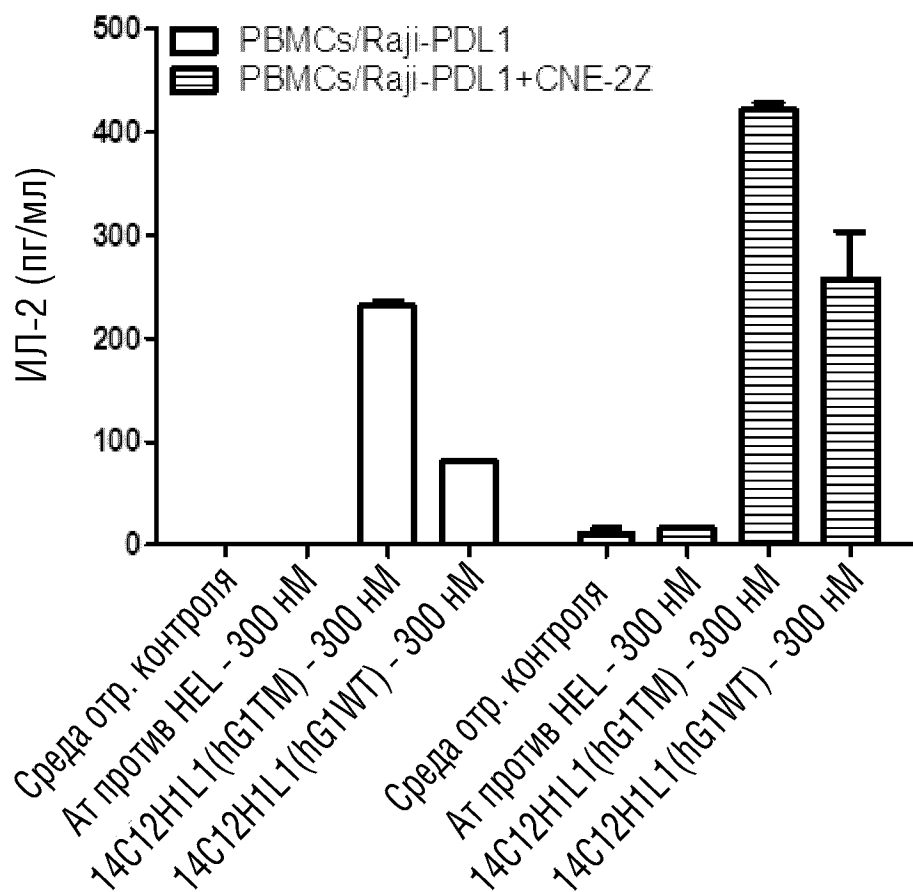
ФИГ.40



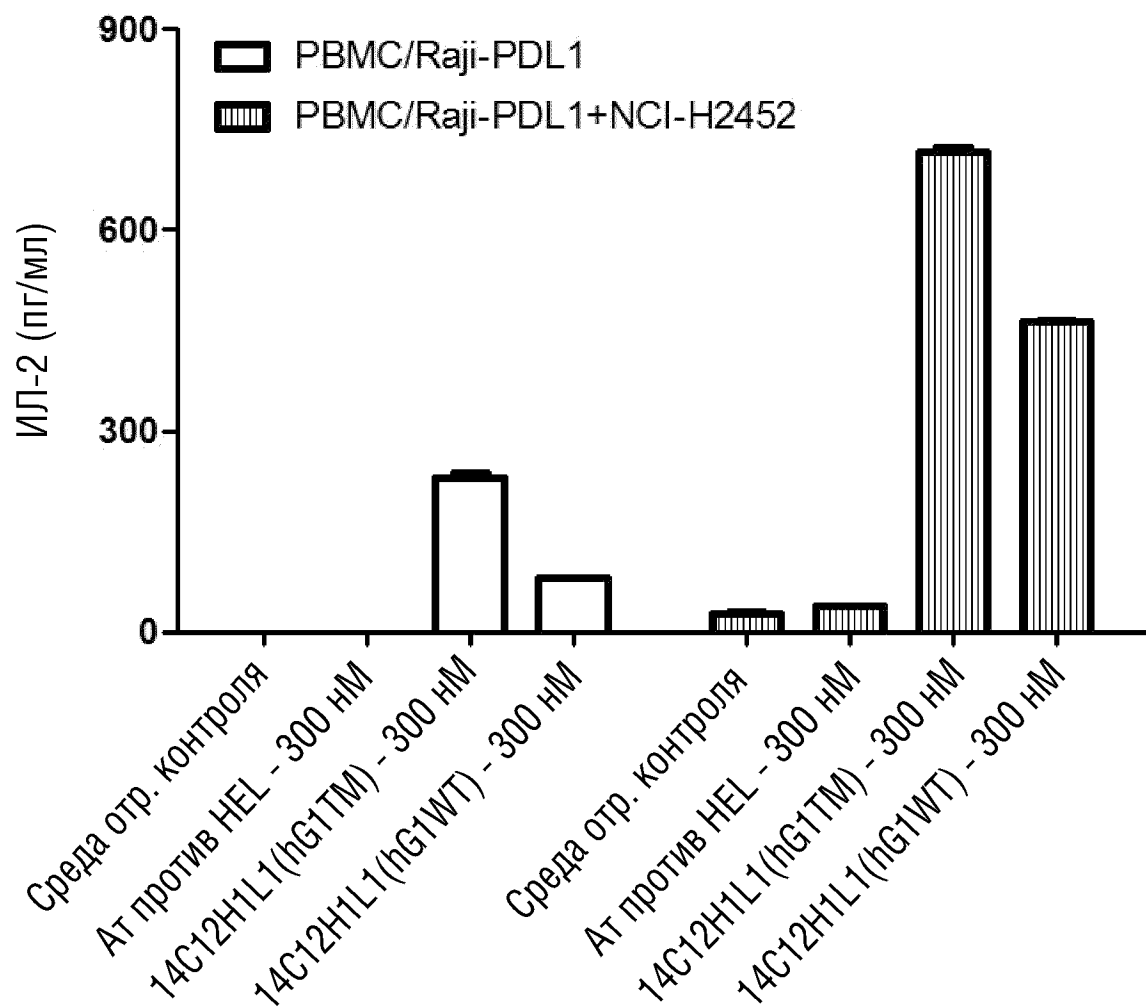
ФИГ.41



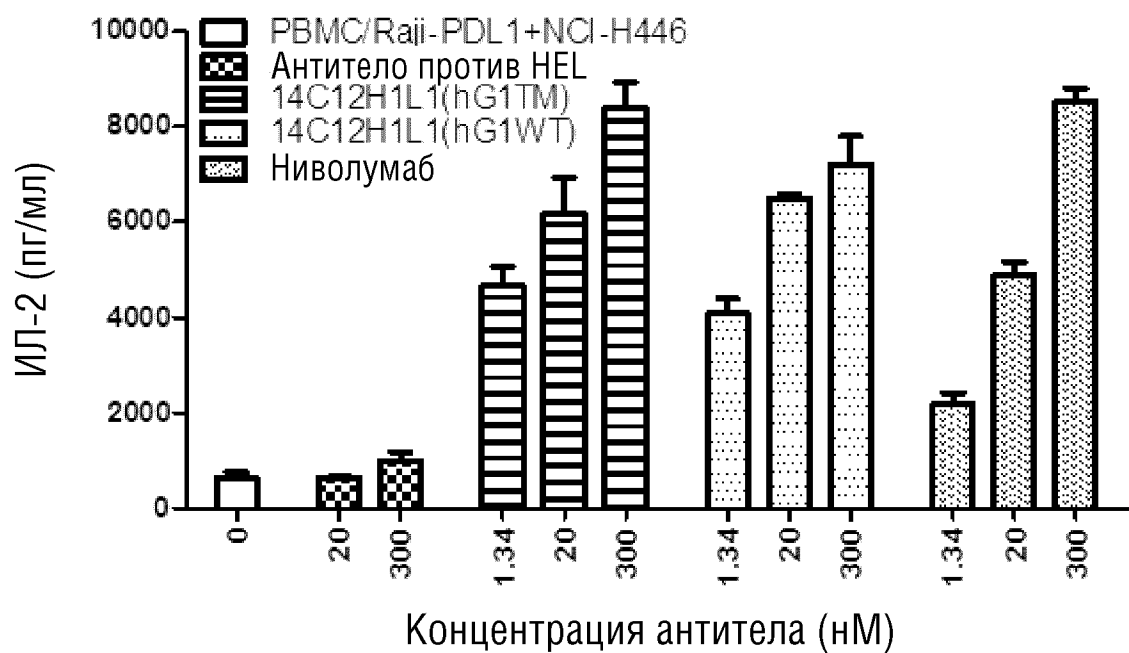
ФИГ.42



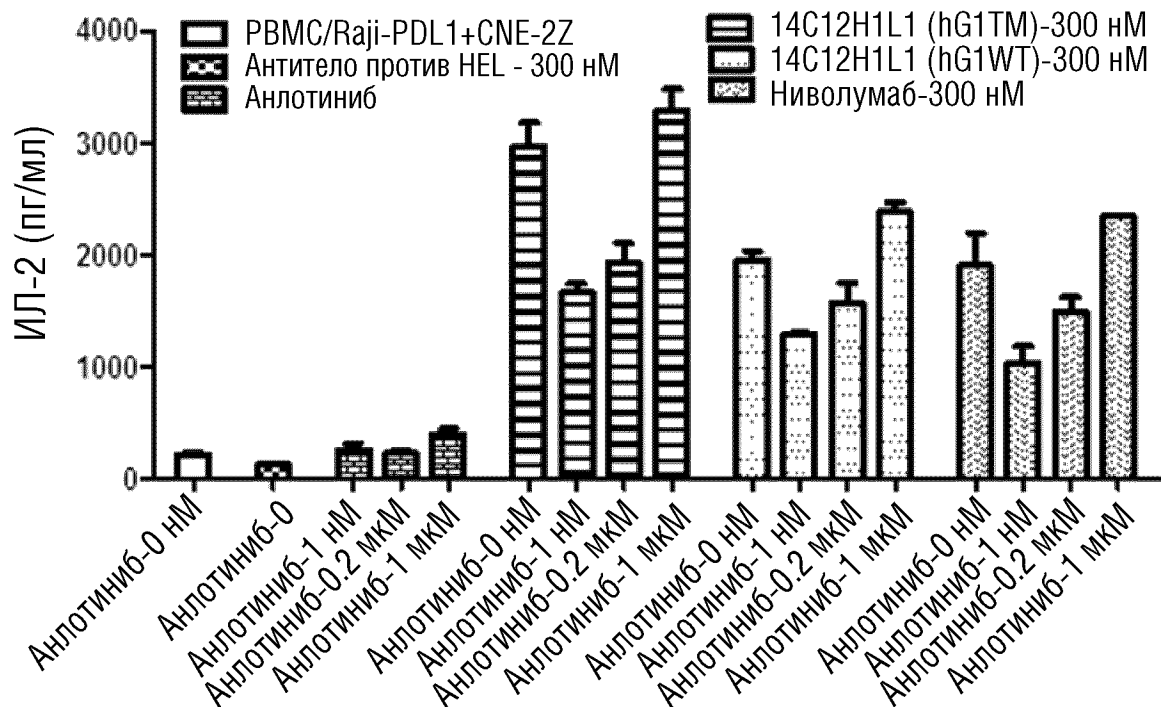
ФИГ.43



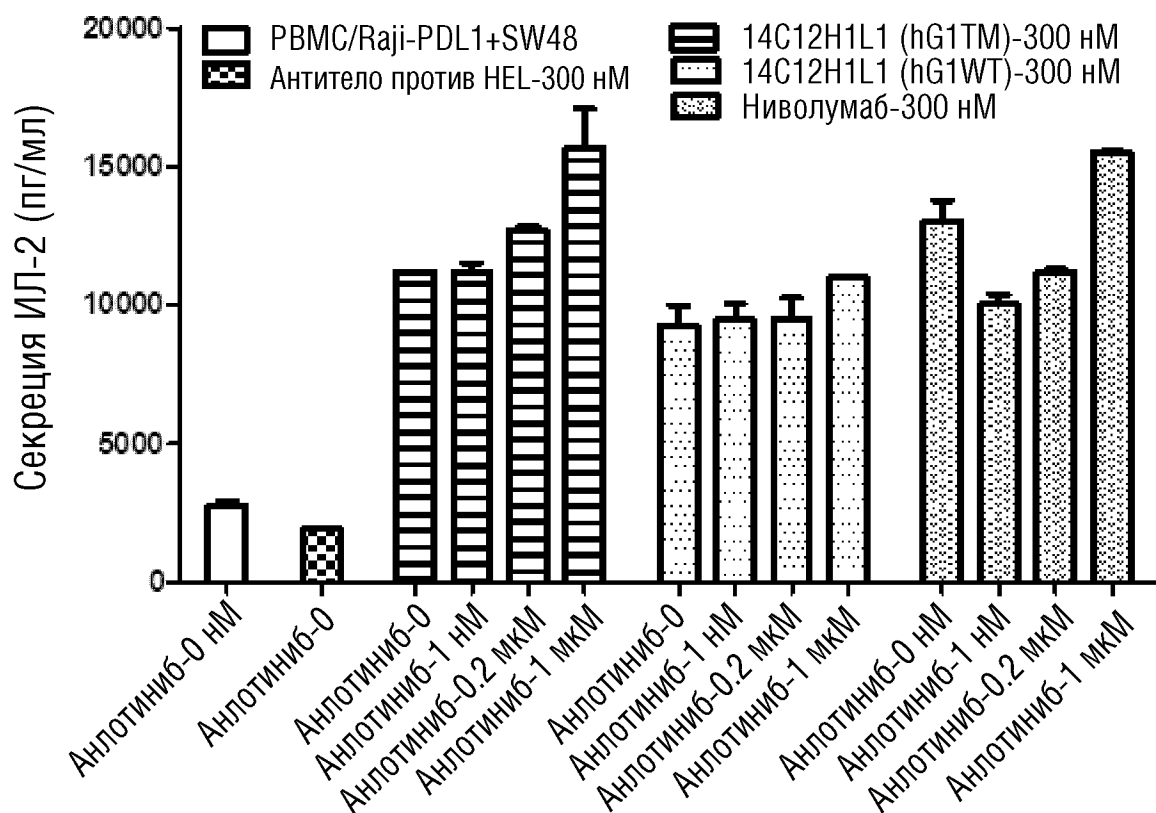
ФИГ.44



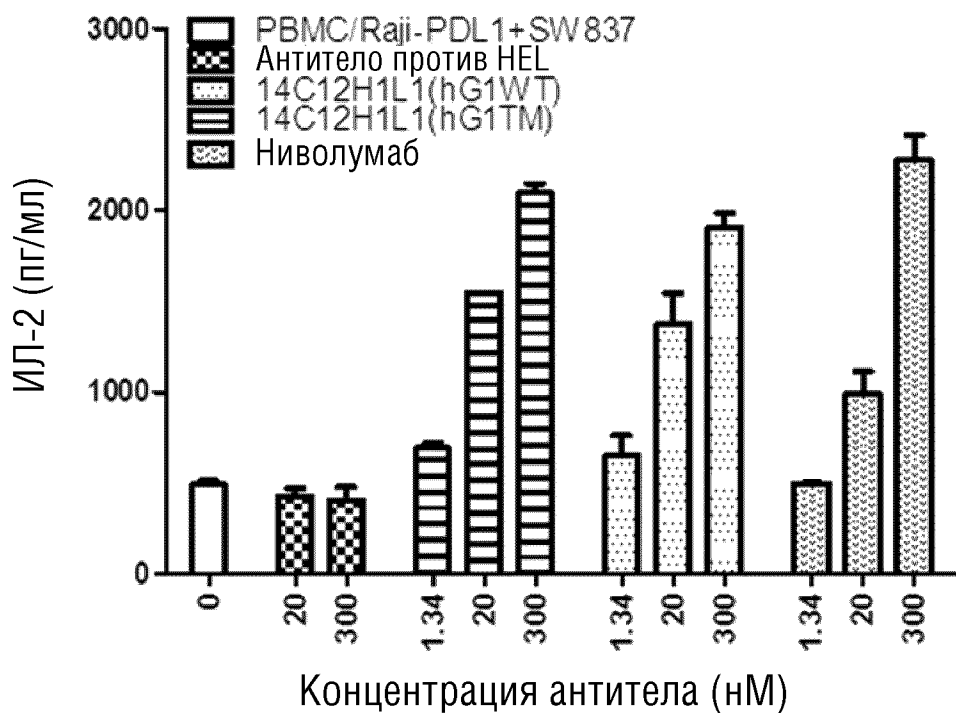
ФИГ.45



ФИГ.46



ФИГ.47



ФИГ.48

