

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042479**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.17

(21) Номер заявки
201990570

(22) Дата подачи заявки
2017.08.22

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(54) МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ PD1, ЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **201610705763.5**

(32) **2016.08.23**

(33) **CN**

(43) **2019.08.30**

(86) **PCT/CN2017/098465**

(87) **WO 2018/036472 2018.03.01**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**СИСИТИКЬЮ - АКЕСО (ШАНХАЙ)
БИОМЕД. ТЕК.КО., ЛТД. (CN)**

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

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

(56) CN-A-106977602
CN-A-106967172
CN-A-105175544
CN-A-105175545
CN-A-104250302
WO-A1-2015112800
CN-A-104936982
CN-A-102264762
CN-A-103608040

(57) Моноклональное антитело против PD1 (белка 1 запрограммированной клеточной смерти) или его антигенсвязывающий фрагмент, его фармацевтическая композиция и их применение. Варибельная область тяжелой цепи моноклонального антитела содержит CDR (область, определяющую комплементарность) с аминокислотными последовательностями, указанными в SEQ ID NO: 9-11; и/или варибельная область легкой цепи моноклонального антитела содержит CDR с аминокислотными последовательностями, указанными в SEQ ID NO: 12-14. Моноклональное антитело может специфически связываться с PD1, ослаблять иммуносупрессию PD1 в организме и активировать Т-лимфоциты.

B1**042479****042479****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение принадлежит к области терапии опухолей и молекулярной иммунологии и относится к антителу против PD1, фармацевтической композиции и способам применения. В частности, настоящее изобретение относится к моноклональному антителу против PD1.

Уровень техники

Трансмембранный рецептор PD1 (белок 1 запрограммированной клеточной смерти, также известный как PD-1) является членом семейства генов CD28, экспрессируемых в активированных Т-клетках, В-клетках и миелоидных клетках. Оба лиганда PD1 (т.е. PDL1 и PDL2) принадлежат к суперсемейству B7; причем PDL1 широко экспрессируется во множестве клеток, включая Т-клетки, В-клетки, эндотелиальные клетки и эпителиальные клетки, тогда как PDL2 экспрессируется только в антигенпрезентирующих клетках, таких как дендритные клетки и макрофаги.

Т-клетки играют очень важную роль в устранении вирусных инфекций, а противовирусный ответ Т-клеток обычно связан с иммунопатогенезом. PD1 играет жизненно важную роль в негативной регуляции активации Т-клеток. Хотя PD1-опосредованная негативная регуляция на Т-клетках может уменьшать повреждение тканей, вызванное инфекцией, блокирование или ингибирование негативного регуляторного эффекта PD1 может приводить к аутоиммунным заболеваниям, например вирусная инфекция поджелудочной железы может быть более эффективно устранена у мышей, с нокаутированным геном PD1, но может приводить к более серьезному повреждению печени (Isai et al., 2003, J. Exp. Med., 198:39-50). Кроме того, опухоли с высокой экспрессией PD1 часто развиваются при раковых заболеваниях, которые трудно обнаруживать (Hamanishi et al., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 104:3360-5). Общепринятый способ регулирования экспрессии PD1 заключается во введении антител в организм.

В связи с широкими противоопухолевыми перспективами и поразительной эффективностью антител к PD1, обычно считается, что антитела против метаболических путей PD1 приведут к прорывам в лечении различных опухолей: немелкоклеточного рака легкого, почечно-клеточного рака, рака яичника, меланомы (Homet M.B., Parisi G. et al., Anti-PD1 Therapy in Melanoma. Semin Oncol., 2015 Jun, 42(3):466-473), лейкоза и анемии (Held S.A., Heine A. et al., Advances in immunotherapy of chronic myeloid leukemia CML, Curr. Cancer Drug Targets, 2013 Sep, 13(7):768-74).

С момента раскрытия беспрецедентных данных о клинической эффективности на ежегодных совещаниях Американской ассоциации исследований рака (AACR) и Американского общества клинической онкологии (ASCO) в 2012 и 2013 гг. антитела против PD1 стали самыми востребованными новыми лекарственными средствами в исследованиях и разработках в глобальной фармацевтической индустрии.

В настоящее время все еще существует потребность в разработке новых антител против PD1 с лучшей эффективностью связывания, чтобы эффективно блокировать связывание PD1 с PDL1.

Сущность изобретения

Благодаря углубленным исследованиям и творческой работе путем иммунизации мышей рекомбинантным PD1, экспрессируемым в системе экспрессии клеток млекопитающих в качестве антигена, авторы изобретения получили клетки гибридомы путем слияния спленоцитов мыши и клеток миеломы. Путем скрининга большого количества образцов авторы изобретения получили линию клеток гибридомы LT003 (депозитарный номер доступа CCTCC: C2015105).

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что линия клеток гибридомы LT003 способна секретировать специфическое моноклональное антитело (названное 14C12), связывающееся специфически с PD1, и это моноклональное антитело может эффективно блокировать соединение PD1 с PDL1.

Кроме того, изобретатели новым способом создали гуманизированное антитело против PD1 (названное 14C12H1L1).

Еще более неожиданно, что авторы изобретения обнаружили, что антитела 14C12 и 14C12H1L1 в данном документе могут эффективно связываться с Т-клетками человека, активировать Т-клетки и индуцировать секрецию ИФН- γ и ИЛ-2 из лимфоцитов человека. Антитела 14C12 и 14C12H1L1 в данном документе потенциально могут стать лекарственными средствами для профилактики и лечения злокачественных новообразований, включая рак легкого, меланому, рак почки, рак яичника и лейкоз, а также анемию.

Следующее предусмотрено настоящим изобретением.

Настоящее изобретение относится к моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, в котором

вариабельная область тяжелой цепи (V_H) указанного моноклонального антитела содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 9-11; и/или

вариабельная область легкой цепи (V_L) указанного моноклонального антитела содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 12-14.

В некоторых примерах данного изобретения раскрыто указанное моноклональное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, причем

аминокислотную последовательность V_H моноклонального антитела выбирают из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 6; и/или

аминокислотную последовательность V_L моноклонального антитела выбирают из SEQ ID NO: 4 и

SEQ ID NO: 8.

В примере данного изобретения раскрыто указанное моноклональное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, причем моноклональное антитело содержит

(1) V_H представленную SEQ ID NO: 2 и V_L представленную SEQ ID NO: 4;

(2) V_H представленную SEQ ID NO: 6 и V_L представленную SEQ ID NO: 8.

Вариабельные области в тяжелой и легкой цепях антитела регулируют активность связывания. Каждая цепь содержит три гипервариабельные области, а именно определяющая комплементарность область (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в тяжелой (H) цепи и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в легкой (L) цепи), которые определяют по Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (1991), volume 1-3, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD).

Посредством методик, хорошо известных техническому специалисту в описанной в данном документе области техники, например анализа аминокислотных последовательностей в CDR моноклональных антител в пунктах (1) и (2) выше через базу данных VBASE2,

антитела 14C12 и 14C12H1L1 в данном документе содержат одинаковые CDR,

причем аминокислотные последовательности 3 областей CDR V_H являются следующими:

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO:9),

HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO:10),

HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO:11);

при этом аминокислотные последовательности 3 областей CDR V_L являются следующими:

LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO:12),

LCDR2: RAN (SEQ ID NO:13),

LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO:14).

В определенном примере раскрыто указанное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбирают из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, CDR, одноцепочечных антител (например, scFv), гуманизированных антител, химерных антител или биспецифических антител.

В определенных вариантах осуществления раскрыто указанное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное моноклональное антитело связывается с белком PD1 с K_D , равной менее чем приблизительно 10^{-5} М, например менее чем приблизительно 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} М или менее; предпочтительно измеренной с помощью оборудования для молекулярного взаимодействия Fortebio.

В определенных вариантах осуществления раскрыто указанное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное моноклональное антитело связывается с белком PD1 с EC_{50} , равной менее чем приблизительно 100 нМ, например менее чем приблизительно 10, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 нМ, или менее. В частности, указанную EC_{50} определяют посредством опосредованной ИФА.

В определенных вариантах осуществления раскрыто указанное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное моноклональное антитело связывается с белком PD1 с K_D , равной менее чем приблизительно 10^{-5} М, такой как менее чем приблизительно 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} М или менее.

В некоторых вариантах осуществления раскрыто указанное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное моноклональное антитело содержит области, отличные от CDR, полученные от видов, отличных от мыши, например от человека.

В определенных вариантах осуществления раскрыто указанное моноклональное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, причем указанное моноклональное антитело продуцируется линией клеток гибридомы LT003, а указанная линия клеток гибридомы LT003 депонирована в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) с депозитарным номером доступа CCTCC: C2015105.

Настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, способную кодировать V_H антитела, причем V_H указанного антитела содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 9-11.

В частности, тяжелая цепь указанного антитела имеет аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 6.

Более конкретно, указанная молекула нуклеиновой кислоты имеет нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5.

Настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, способную кодировать V_L антитела, причем V_L указанного антитела содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 12-14.

В частности, V_L указанного антитела имеет аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 8.

Более конкретно, указанная молекула нуклеиновой кислоты имеет нуклеотидные последовательности

сти SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 7.

Настоящее изобретение относится к вектору, содержащему выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в данном изобретении.

Настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в данном изобретении, или вектор, описанный в данном изобретении.

Настоящее изобретение относится к способу получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающих фрагментов, описанному в данном изобретении, путем культивирования клетки-хозяина в данном изобретении в соответствующих условиях и выделения указанного моноклонального антитела или его антигенсвязывающих фрагментов из культуры клеток.

Настоящее изобретение относится к линии клеток гибридомы LT003, которая депонирована в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) с депозитарным номером доступа CCTCC: C2015105.

Настоящее изобретение относится к конъюгату, который состоит из моноклонального антитела или его антигенсвязывающих фрагментов и конъюгируемой части, причем указанное моноклональное антитело представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, описанное в данном изобретении, а указанная конъюгируемая часть представляет собой детектируемый маркер. В частности, указанная конъюгируемая часть представляет собой радиоактивные изотопы, флуоресцеин, люминесцентные вещества, красители или ферменты.

Настоящее изобретение относится к наборам реагентов, состоящим из моноклонального антитела или его антигенсвязывающих фрагментов или их конъюгатов, описанных в изобретении.

В частности, наборы реагентов могут содержать вторичное антитело, которое специфически распознает указанное моноклональное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты; необязательно указанное вторичное антитело может содержать детектируемые маркеры, такие как радиоактивные изотопы, флуоресцеин, люминесцентные вещества, красители или ферменты.

Настоящее изобретение относится к применению указанного моноклонального антитела, или его антигенсвязывающих фрагментов, или его конъюгатов, описанных в изобретении, для создания наборов реагентов, причем указанные наборы реагентов используются для обнаружения наличия или уровня PD1 в образцах.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей указанное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающие фрагменты, или их конъюгаты, описанные в изобретении. Необязательно она также может содержать фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

Настоящее изобретение относится к применению указанного моноклонального антитела, или его антигенсвязывающих фрагментов, или их конъюгатов, описанных в изобретении, при изготовлении лекарственных средств для профилактики и/или лечения, и/или адъювантного лечения, и/или диагностики опухолей или анемии; в частности, указанные опухоли могут представлять собой меланому, рак почки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак печени, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника и лейкоз.

Авторы данного изобретения обнаружили в экспериментах на животных, что 14C12H1L1 может эффективно ингибировать рост опухолевых клеток MC38, инокулированных, подкожно в правый бок мышам PD-1 HuGEMM, у которых лекарственное средство на основе антитела 14C12H1L1 может значительно ингибировать рост опухоли у мышей-носителей опухоли PD-1 HuGEMM, имея эффективность, эквивалентную продаваемому лекарственному средству на основе моноклонального антитела ниволумаб, которое является утвержденным лекарственным средством, нацеленным на ту же самую мишень.

Настоящее изобретение относится к применению моноклонального антитела, или его антигенсвязывающих фрагментов, или их конъюгатов, описанных в данном изобретении, для изготовления лекарственных средств для следующих целей:

- блокирование связывания PD1 с лигандом PD1,
- регуляция (например, понижение) активности или уровня PD1,
- ослабление иммуносупрессии PD1, или
- повышение экспрессии ИФН- γ и/или ИЛ-2 в Т-лимфоцитах;
- конкретно, указанный лиганд PD1 представляет собой PDL1 или PDL2, предпочтительно PDL1.

Настоящее изобретение относится к способу *in vivo* или *in vitro* применения к клеткам или субъектам, нуждающимся в этом, эффективной дозы моноклонального антитела, или его антигенсвязывающих фрагментов, или их конъюгатов, описанных в данном изобретении, а указанный способ выбирают из следующего:

- способы блокирования связывания PD1 с лигандом PD1,
- способы регулирования (например, понижения) активности или уровня PD1,
- способы ослабления иммуносупрессии PD1, или
- способы повышения экспрессии ИФН- γ и/или ИЛ-2 в Т-лимфоцитах;
- конкретно, указанный лиганд PD1 представляет собой PDL1 или PDL2, предпочтительно PDL1.

В конкретном примере данного изобретения указанный способ *in vitro* предназначен для нетерапевтических или недиагностических целей.

Интерферон γ (ИФН γ) в основном вырабатывается естественными клетками-киллерами (НК) и естественными киллерными Т-клетками (НКТ) или продуцируется эффекторными Т-клетками, состоящими из CD4 Th1-клеток и CD8 цитотоксических Т-лимфоцитов, после стимуляции специфическими антигенами. Являясь важным цитокином врожденного и приобретенного иммунитета, ИФН γ играет важную роль в противодействии или ингибировании вирусных, некоторых бактериальных инфекций и инфекций, вызванных простейшими. Между тем ИФН γ может активировать макрофаги и индуцировать экспрессию главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) 2-го типа, чтобы активировать иммунные ответы для контроля прогрессирования опухолей (Schoenborn J.R., Wilson C.B., Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses, *Advances in Immunology*, 2007, 96:41-101). В исследовании данного изобретения *in vitro* антитело против PD1 может индуцировать секрецию ИФН γ для активации иммунных ответов.

Интерлейкин 2 (ИЛ-2), продуцируемый Т-клетками, является фактором роста, регулирующим субпопуляции Т-клеток, и решающим фактором, регулирующим иммунные ответы, способствующим пролиферации активированных В-клеток и участвующим в реакциях антител, кроветворении и онкологическом надзоре. Рекомбинантный ИЛ-2 человека был одобрен FDA (Управление по контролю пищевых продуктов и лекарственных средств) США для лечения злокачественных опухолей (включая меланому, опухоль почки и т.д.) во время прохождения клинических исследований для лечения хронических вирусных инфекций (Chavez, A.R. et al., Pharmacologic administration of interleukin-2, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2009, 1182, p.14-27). В исследованиях *in vitro* антитело против PD1 по данному изобретению может специфически ослабить иммуносупрессию PD1, активировать Т-клетки и индуцировать выработку ИЛ-2, демонстрируя многообещающие перспективы широкого применения в генной терапии опухолевых и паразитарных заболеваний.

Моноклональное антитело, или его антигенсвязывающие фрагменты, или их конъюгаты, описанные в данном изобретении, применяются для профилактики и/или лечения, и/или адъювантного лечения, и/или диагностики опухолей или анемии; в частности, указанные опухоли могут представлять собой меланому, рак почки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак печени, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника или лейкоз.

Моноклональное антитело, или его антигенсвязывающие фрагменты, или его конъюгаты, описанные в данном изобретении, применяются для

- блокирования связывания PD1 с лигандом PD1,
- регуляции (например, понижение) активности или уровня PD1,
- ослабления иммуносупрессии PD1, или
- повышения экспрессии ИФН- γ и/или ИЛ-2 в Т-лимфоцитах;
- конкретно, указанный лиганд PD1 представляет собой PDL1 или PDL2, предпочтительно PDL1.

В конкретном примере данного изобретения моноклональное антитело, или его антигенсвязывающие фрагменты, или их конъюгаты, описанные в данном изобретении, блокируют только связывание PD1 с PDL1.

Настоящее изобретение относится к способу профилактики, и/или лечения, и/или адъювантного лечения, и/или диагностики опухолей или анемии, включающему процедуру применения к субъектам эффективной дозы моноклонального антитела, или его антигенсвязывающих фрагментов, или их конъюгатов, описанных в данном изобретении; в частности, указанные опухоли могут представлять собой меланому, рак почки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак печени, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника или лейкоз.

Если в данном документе не указано иное, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, должны иметь значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области техники. Кроме того, лабораторные методы культивирования клеток и тканей, молекулярной генетики, химии олиго- или полинуклеотидов и иммунологии, описанные в данном документе, хорошо известны и широко используются в данной области техники. Между тем, чтобы лучше понять настоящее изобретение, следует понимать, что следующие термины, если не указано иное, имеют следующие значения.

Используемый в данном изобретении термин "аминокислотная последовательность белка PD1 (белок 1 запрограммированной клеточной смерти, NCBI GenBank: NP_005009.2)" охватывает полноразмерный белок PD1 или PD1ECD (внеклеточный сегмент PD1) или PD1ECD-содержащие фрагменты; и также включает слитый белок PD1ECD, например слитый с фрагментами белка Fc IgG мыши или человека (mFc или hFc). Кроме того, специалистам в данной области техники понятно, что аминокислотная последовательность белка PD1 может иметь естественные или искусственные мутации (включая без ограничения замены, делеции и/или вставки), не влияющие на его биологические функции. Следовательно, в данном изобретении термин "белок PD1" должен включать все такие последовательности и их природные или искусственные варианты. Кроме того, при описании фрагментов последовательности белка PD1 ука-

занные фрагменты последовательности включают как фрагменты последовательности, так и соответствующие фрагменты последовательности в ее естественных или искусственных вариантах.

Используемый в данном изобретении термин "аминокислотная последовательность белка PDL1 (лиганд 1 запрограммированной клеточной смерти, NCBI Genebank ID: NP_054862.1)" охватывает полноразмерный белок PDL1 или PDL1ECD (внеклеточный сегмент PDL1) или PDL1ECD-содержащие фрагменты; и также включает слитый белок PDL1ECD, например слитый с фрагментами белка Fc IgG мыши или человека (mFc или hFc). Кроме того, специалистам в данной области техники понятно, что аминокислотная последовательность белка PDL1 может иметь естественные или искусственные мутации (включая без ограничения замены, делеции и/или вставки), не влияющие на его биологические функции. Следовательно, в данном изобретении термин "белок PDL1" должен включать все такие последовательности и их природные или искусственные варианты. Кроме того, при описании фрагментов последовательности белка PDL1 указанные фрагменты последовательности включают как фрагменты последовательности, так и соответствующие фрагменты последовательности в ее естественных или искусственных вариантах.

Используемый в данном изобретении термин "EC₅₀" относится к концентрации для обеспечения 50% максимального эффекта.

Используемый в данном изобретении термин "антитело" относится к белкам иммуноглобулинов, которые обычно состоят из двух пар полипептидных цепей (каждая пара имеет "легкую" (L) цепь и "тяжелую" (H) цепь). Легкие цепи классифицируются как легкие цепи κ и λ . Тяжелые цепи классифицируются как μ , δ , γ , α и ϵ и, соответственно, определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. В легких цепях и тяжелых цепях переменные области и константные области связаны "J"-областью, состоящей из около 12 или более аминокислот. Тяжелая цепь также содержит область "D"-область с около 3 или более аминокислотами. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область (V_H) и константную область (C_H), которая состоит из 3 доменов (C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь содержит переменную область (V_L) и константную область (C_L), которая состоит из одного домена C_L. Константная область может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и компонент 1q (C1q) комплекса классической системы комплемента. V_H и V_L также могут быть подразделены на области с высокой изменчивостью (называемые областью, определяющей комплементарность (CDR)), которые разделены относительно консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). От аминоконца до карбоксильного конца каждая V_H и V_L состоит из 3 CDR и 4 FR в порядке FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Переменные области (V_H и V_L) тяжелой цепи и легкой цепи образуют сайт связывания антитела. Распределение аминокислот по областям или доменам соответствует определениям Kabat в Sequences of Proteins of Immunological Interest (Национальный институт здоровья Бетесда, штат Мэриленд (1987 и 1991)) или Chothia & Lesk (1987), Mol. Biol., 196:901-917; или Chothia et al. (1989), Nature, 342:878-883. Термин "антитело" не ограничен каким-либо конкретным способом их получения. Например, он включает, в частности, рекомбинантные антитела, моноклональные антитела и поликлональные антитела. Антитела могут быть разных изотипов, например антителами IgG (такие как подтипы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM.

Используемый в данном изобретении термин "антигенсвязывающие фрагменты" относится к полипептиду, содержащему фрагменты полноразмерного антитела, сохраняющему способность специфически связываться с тем же антигеном и/или конкурировать с полноразмерным антителом за связывание с антигеном, который также называют "антигенсвязывающей частью". См. Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed. 2, Raven Press, N. Y. (1989)), включая всю статью и ссылки в данном изобретении для всех целей. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены методами рекомбинантной ДНК или расщеплением интактных антител протеолитическими ферментами или химическими веществами. В некоторых случаях антигенсвязывающие фрагменты включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb и CDR, одноцепочечные антитела (например, scFv), химерные антитела, диатела и полипептиды, которые по меньшей мере содержат часть антитела, достаточную для придания специфической антигенсвязывающей способности полипептидам.

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент представляет собой диатело, а именно фрагмент димерного антитела, чьи домены V_H и V_L экспрессируются на одной полипептидной цепи, однако из-за использования слишком короткого линкера, чтобы позволить спаривание между двумя доменами той же цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами в другой цепи с образованием двух антигенсвязывающих сайтов (см., например, Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:6444-6448 (1993); и Poljak R.J. et al., Structure 2: 1121-1123 (1994)).

Используя обычные методики, известные специалистам в данной области техники (такие как технология рекомбинантных ДНК или ферментативное/химическое расщепление), антигенсвязывающий фрагмент (такой как описанные выше фрагменты антител) может быть получен из данного антитела (например, моноклональные антитела 14C12, 14C12H1L1, предоставленные в данном изобретении) и проведен его скрининг на специфичность таким же образом, как и для полноразмерного антитела.

В данном изобретении, если не указано иное, термин "антитело" относится не только к интактному антителу, но также к антигенсвязывающим фрагментам антитела.

Используемые в данном изобретении термины "mAb" и "моноклональные антитела" относятся к антителу или фрагменту антитела, полученному из группы высокомолекулярных антител, т.е. из группы идентичных молекул антител за исключением мутаций, которые могут возникать самопроизвольно. Моноклональное антитело обладает высокой специфичностью в отношении одного эпитопа на антигене. Поликлональные антитела отличаются от моноклональных антител, содержащих по меньшей мере 2 или более разных антител, которые обычно распознают разные эпитопы на антигене. Моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридомной технологии, о которой первоначально сообщалось Kohler et al. (Nature, 256:495 (1975)), а также технологии рекомбинантных ДНК (см. патент США 4816567).

Используемый в данном изобретении термин "гуманизованное антитело" относится к антителу или его фрагментам, полученным из иммуноглобулина человека (рецепторное антитело), чьи CDR или часть CDR заменены областями CDR антитела, полученного не от человека (донорное антитело), причем донорское антитело может представлять собой антитело, не относящееся к антителу человека (например, мыши, крысы или кролика) с предсказуемой специфичностью, аффинностью связывания или реакционной способностью. Кроме того, некоторые аминокислотные остатки каркасной области (FR) рецепторного антитела также могут быть заменены соответствующими аминокислотными остатками, не относящимися к человеку, или заменены аминокислотными остатками других антител для дальнейшего улучшения или оптимизации эффективности антитела. Для более подробной информации о гуманизованных антителах, см., например, 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).

Используемый в данном изобретении термин "изолят" или "выделенный" означает полученный искусственным путем в естественном состоянии. Если в природе существует определенный вид "выделенного" вещества или компонента, он может получаться из-за изменения его естественной среды или изолироваться из естественной среды или и тем, и другим. Например, полинуклеотид или полипептид в естественном существовании у живого животного будет называться "выделенным", если он был выделен с высокой степенью чистоты в том же естественном состоянии. Термин "выделять" или "выделенный" не исключает наличия искусственного или синтетического вещества или других примесей, которые не влияют на активность.

Используемый в данном изобретении термин "вектор" относится к носителю для доставки нуклеиновой кислоты, который может быть введен с полинуклеотидом. Вектор, который может содержать блок, который кодируется экспрессируемым введенным полинуклеотидом, называется вектором экспрессии. Векторы могут быть введены в клетку-хозяина путем трансформации, трансдукции или трансфекции, поэтому генетические вещества, переносимые вектором, могут быть экспрессированы в клетке-хозяине. Векторы хорошо известны техническому персоналу в данной области техники, включая без ограничения плазмиду; фазмиду; космиду; искусственную хромосому, такую как дрожжевая искусственная хромосома (YAC), бактериальная искусственная хромосома (BAC) или искусственная хромосома, полученная из P1 (PAC); фаг, такой как фаг λ или фаг M13, а также вирусы животных и т.д. Вирусы животных могут включать в себя без ограничения вирус с обратной транскриптазой (включая лентивирус), аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса), вирус ветряной оспы, бакуловирус, папилломавирус и паповавирус (такой как SV40). Вектор может содержать множество компонентов, которые контролируют экспрессию, включая без ограничения промотор, фактор инициации транскрипции, энхансер, селективный элемент и репортерный ген. Кроме того, вектор также может содержать сайт инициации репликации.

Используемый в данном изобретении термин "клетка-хозяин" относится к клеткам, которые могут импортировать векторы, включая без ограничения прокариотические клетки, такие как *E. coli* и *Bacillus subtilis*, клетки грибов, такие как дрожжи и *Aspergillus*, клетки насекомых, такие как клетки дрозофилы S2 и Sf9, или клетки животных, такие как клетки фибробластов, клетки CHO, клетки COS, клетки NSO, клетки HeLa, клетки BHK, клетки HEK293 или клетки человека.

Используемый в данном изобретении термин "специфическое связывание" относится к неслучайному связыванию между двумя молекулами, такому как взаимодействие между антителом и его антиген-мишенью. В некоторых вариантах осуществления специфическое связывание антитела с антигеном означает аффинность (K_D), например, менее чем около 10^{-5} М, в частности менее чем 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} М или менее.

Используемый в данном изобретении термин " K_D " относится к константе равновесия диссоциации специфического взаимодействия между антителом и антигеном для описания аффинности связывания между антителами и антигенами. Чем меньше константа диссоциации равновесия, тем сильнее антитело связывается с антигеном, тем выше аффинность между антителом и антигеном. Как правило, антитела (например, моноклональные антитела 14C12, 14C12H1L1 в данном изобретении) связываются с антигенами (например, белок PD1) с K_D менее чем приблизительно 10^{-5} М, например менее чем 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} или 10^{-10} М, или даже менее. K_D может быть измерена любым методом, хорошо известным техниче-

скому персоналу в данной области техники, например, с использованием системы Fortebio Octet. Используемые в данном изобретении термины "моноклональное антитело" и "mAb" имеют одинаковое значение и используются взаимозаменяемо; термины "поликлональное антитело" и "PcAb" имеют одинаковое значение и используются взаимозаменяемо; термины "полипептид" и "белок" имеют одинаковое значение и используются взаимозаменяемо. Также в данном изобретении аминокислоты обычно представлены однобуквенными или трехбуквенными сокращениями, известными в данной области техники. Например, аланин может быть представлен как A или Ala.

Используемые в данном изобретении термины "гибридома" и "линия клеток гибридомы" могут использоваться взаимозаменяемо и, когда упоминаются в данном документе, включают субклон и клетки-потомки гибридомы. Например, когда упомянута в данном документе, линия клеток гибридомы LT003 также включает субклон и клетки-потомки LT003.

Используемый в данном изобретении термин "фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент" относится к носителю и/или эксципиенту, фармацевтически и/или физиологически совместимому с субъектами и активными ингредиентами и широко признанному в данной области техники (Remington's Pharmaceutical Sciences, Edited by Gennaro AR, 19th ed., Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), включая без ограничения регуляторы pH, поверхностно-активные вещества, адъюванты и усилители ионной силы. Например, регуляторы pH включают без ограничения фосфатный буферный раствор; поверхностно-активные вещества включают без ограничения катионные, анионные или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Твин-80; усилители ионной силы включают без ограничения хлорид натрия.

Используемый в данном изобретении термин "эффективная доза" определяется как количество терапевтического средства, достаточное для достижения или, по меньшей мере, частичного достижения желаемого эффекта. Например, эффективная профилактическая доза (например, для рака) представляет собой количество для предотвращения, остановки или задержки возникновения заболеваний (например, рака); эффективная доза лечения представляет собой количество, которое излечивает или, по меньшей мере, частично, останавливает заболевание и его осложнения у пациентов с заболеванием. Определение такой эффективной дозы полностью находится в пределах возможностей технического персонала в данной области техники. Например, эффективная доза лечения будет зависеть от тяжести заболевания, общего состояния иммунной системы пациента, общего состояния пациентов, такого как возраст, масса и пол, способ введения указанного лекарственного средства и других сопутствующих методов лечения и т.п.

Эффекты изобретения.

Моноклональные антитела по данному изобретению, особенно 14C12H1L1, способны специфически связываться с PD1, эффективно блокируя связывание PD1 с PDL1 и ослабляя иммуносупрессию PD1 для активации Т-лимфоцитов. При этом антитело 14C12H1L1 против PD1 может индуцировать секрецию ИФН- γ и ИЛ-2 намного лучше, чем контрольное антитело 5C4 (5C4: PD1 антитело от Medarex Inc.: Alan J.Korman, et al., Human monoclonal antibodies to programmed death 1 (PD1) and methods for treating cancer using anti-PD1 antibodies alone or in combination with other immunotherapeutics, патент США № US 8008449 B2). Моноклональные антитела по данному изобретению, особенно 14C12H1L1, обладают противоопухолевым эффектом, эквивалентным одобренному препарату ниволумаб для той же мишени. Антитела по данному изобретению обладают потенциалом стать или быть использованными в изготовлении в лекарственных средствах для профилактики и/или лечения немелкоклеточного рака легкого, почечно-клеточного рака, рака яичника, меланомы, лейкоза или анемии.

Описание чертежей

На фиг. 1 представлены результаты электрофореза в полиакриламидном геле с ДСН (SDS-PAGE) гуманизированного моноклонального антитела 14C12H1L1. Слева направо: 1 - 1 мкг антитела в невосстановленном загрузочном буфере; 2 - 1 мкг антитела в восстановленном загрузочном буфере; 5 мкл маркера; 3 - 1 мкг БСА.

На фиг. 2 показана кинетика связывания антитела 14C12.

На фиг. 3 - кинетика связывания антитела 14C12H1L1.

На фиг. 4 - кинетика связывания антитела 5C4.

На фиг. 5 представлены результаты ИФА по связыванию 14C12H1L1 и 5C4 с PD1.

На фиг. 6 - результаты конкурентного ИФА по связыванию 14C12H1L1 и 5C4 с PD1 в сравнении с PDL1.

На фиг. 7 показана EC_{50} связывания 14C12H1L1 с PD1 на поверхности клеток 293T-PD1.

На фиг. 8 - активность связывания 14C12H1L1 с поверхностным антигеном PD1 Т-клеток.

На фиг. 9 показано влияние 14C12H1L1 на секрецию ИФН- γ смешанных лимфоцитов.

На фиг. 10 - влияние 14C12H1L1 на секрецию ИЛ-2 смешанных лимфоцитов.

На фиг. 11 - влияние 14C12H1L1 на секрецию цитокина ИЛ-2, индуцированную смешением клеток PBMC, MDA-MB-2 31 и Raji.

На фиг. 12 - влияние 14C12H1L1 на рост опухоли в модели опухоли MC38 у мышей PD-1 HuGEMM.

Линия клеток гибридомы LT003 была депонирована в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) в университете Ухань, г. Ухань, Китай, 430072, 16 июня 2015 г., с депозитарным номером доступа CCTCC: C2015105.

Подробное описание изобретения

Изобретение далее будет описано подробно. Как будет понятно специалисту в данной области техники, следующие примеры используются только для описания изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. Случаи без конкретного описания методов или условий были выполнены в соответствии с литературой в данной области техники (например, Guide to Molecular Cloning, под авторством J. Sambrook et al., переведен Peitang Huang et al., third Edition, Science Press) или в соответствии с инструкцией по применению продукта. Все реагенты или инструменты без указания изготовителя представляли собой обычные продукты, имеющиеся в продаже.

В приведенных ниже примерах используемые Т-клетки были получены от Akeso Biopharma, Inc.; мыши BALB/C были приобретены в Медицинском центре животных провинции Гуандун. Используемые мыши PD-1 HuGEMM были получены от Nanjing Galaxy Biopharma Co., Ltd.; клетки MC3 8 были получены из шанхайского клеточного центра Fudan IBS; коммерческий препарат против той же мишени - используемый ниволумаб (Opdivo®), был получен от Bristol-Myers Squibb Company.

Пример 1. Получение линии клеток гибридомы LT003 и получение моноклонального антитела 14C12.

1. Создание линии клеток гибридомы LT003.

Используется PD1-mFc (PD1: белок 1 запрограммированной клеточной смерти, NCBI GenBank ID: NP_005009.2) слитый белок в качестве антигена и слитые спленоциты иммунизированных мышей BALB/C (приобретенных в Медицинском центре животных провинции Гуандун) и клетки миеломы мыши в клетки гибридомы с помощью общепринятого в настоящее время метода (например, Stewart, S.J., "Monoclonal Antibody Production", в Basic Methods in antibody Production and Characterization, Eds.G.C. Howard and D.R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000).

Покрывали микропланшет PD1-mFc в качестве антигена и подвергали скринингу клетки гибридомы с помощью опосредованного ИФА для получения клеток гибридомы, которые секретируют новые антитела, специфически связывающиеся с PD1.

При скрининге получали линии клеток гибридомы, способные секретировать моноклональные антитела, связывающиеся с PD1, посредством конкурентного ИФА против слитого белка лиганд PDL1-hFc (PDL1: лиганд 1 белка запрограммированной клеточной смерти, NCBI Genebank ID: NP 054862.1), и получали стабильные клеточные линии гибридомы методом ограниченного разведения, а затем получали стабильные линии клеток LT003 методом ограниченного разведения (моноклональное антитело, секретируемое из LT003, называется 14C12).

Линия клеток гибридомы LT003 (PD1-14C12) была депонирована в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) в университете Ухань, г. Ухань, Китай, 430072, 16 июня 2015 г., с депозитарным номером доступа CCTCC: C2015105.

2. Получение моноклонального антитела 14C12.

Линию клеток LT003 в данном изобретении культивировали с использованием среды IMDM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки с низким содержанием IgG, в течение 7 суток, а затем собирали и очищали супернатант культуры клеток для получения антитела 14C12.

Пример 2. Получение последовательностей легкой цепи и тяжелой цепи моноклонального антитела 14C12.

Экстрагировали мРНК из линии клеток гибридомы LT003, полученной в примере 1 выше, в соответствии с руководством для набора реагентов для выделения общей клеточной/бактериальной РНК (Tiangen, продукт № DP430).

Синтезировали кДНК в соответствии с руководством для системы синтеза первой цепи Invitrogen Superscript® III для набора ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскриптазой) и проводили амплификацию ПЦР.

Непосредственно проводили ТА-клонирование с использованием продуктов амплификации ПЦР в соответствии с инструкциями набора для клонирования pEASY-T1 (Transgen CT101).

Секвенировали продукты ТА-клонирования и получили следующие результаты.

Результаты секвенирования ДНК V_H: (354 п. о.).

```
GAGGTCAAACCTGGTGGAGAGCGCGCGGGCTGGTGAAGCCCCGCGGGTCACTGAAACT
GAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCATGGGTGAGGCAGACCCCT
GAGAAGCGCCTGGAATGGGTGCTACTATCAGCGGAGGCGGGCGATACACCTACTATCCTGACT
CTGTCAAAGGGAGATTACAAATTAGTCGGGATAACGCCAGAAATACTCTGTATCTGCAGATGTC
TAGTCTGCGGTCCGAGGATACAGCTCTGTACTATTGTGCAAACCGGTACGGCGAAGCATGGTTT
GCCTATTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTCTCTGCC (SEQ ID NO: 1)
```

Закодированная последовательность белка: (118 а. к.).

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATISGGGRYTY
YPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSLSRSEDALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTIVTSA

(SEQ ID NO: 2)

Результаты секвенирования ДНК V_L: (318 п. о.).

GACATTAAGATGACACAGTCCCCTTCCTCAATGTACGCTAGCCTGGGCGAGCGAGTGAC
CTTCACATGCAAAGCATCCCAGGACATCAACACATACCTGTCTTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGC
AAAAGCCCCAAGACCCTGATCTACCGGGCCAATAGACTGGTGGACGGGGTCCCCAGCAGATTCT
CCGGATCTGGCAGTGGGCAGGATTACTCCCTGACCATCAGCTCCCTGGAGTATGAAGACATGGG
CATCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCTCTGACCTTTGGAGCAGGCACAAAAGTGGAA
CTG (SEQ ID NO: 3)

Закодированная последовательность белка: (106 а. к.).

DIKMTQSPSSMYASLGERVFTTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVP
SRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIIYCLQYDEFPLTFGAGTKLEL (SEQ ID NO: 4)

2. Получение рекомбинантного моноклонального антитела 14C12 (Re).

Отдельно клонировали последовательность кДНК тяжелой цепи (последовательность варибельной области SEQ ID NO: 1) и последовательность кДНК легкой цепи (последовательность варибельной области SEQ ID NO: 3) из 14C12 (Re) в вектор pUC57simple (предоставлен GenScript Biotech Corp.) (сайты ферментативного расщепления: XbaI и BamHI) и получили плазмиды pUC57simple-14C12H и pUC57simple-14C12L соответственно.

Ферментативно расщепляли (HindIII и EcoRI) плазмиды pUC57simple-14C12H и pUC57simple-14C12L соответственно, а затем субклонировали тяжелые и легкие цепи, извлеченные после электрофореза, в вектор pcDNA3.1, экстрагировали обе рекомбинантные плазмиды и котрансфицировали клетки 293F.

Через 7 суток культивирования клеток супернатант культуры клеток центрифугировали посредством высокоскоростного центрифугирования и фильтровали путем вакуумной фильтрации через микропористую мембрану и загружали в колонку HiTrap MabSelectSuRe, а затем антитело элюировали с помощью буфера для элюции за один этап, а затем пропускали через колонку для обессоливания HiTrap и вымыли в фосфатно-солевой буфер (PBS), а затем было получено рекомбинантное антитело 14C12 (Re) после дополнительной очистки.

Как подтверждено анализом ИФА на связывающую активность, рекомбинантное антитело 14C12 (Re) имело связывающую активность, эквивалентную антителу 14C12, и, следовательно, может быть далее использовано в последующем конструировании гуманизации антител.

Пример 3. Конструирование последовательностей легкой цепи и тяжелой цепи гуманизированного антитела 14C12H1L1.

1. Конструирование последовательностей легкой цепи и тяжелой цепи гуманизированного антитела 14C12H1L1.

По данным трехмерной кристаллической структуры белка PD1 (Shinohara, T. et al., Structure and chromosomal localization of the human PD1 gene (PDCD1), Genomics, 1995, 23 (3):704-6)) и последовательностей антитела 14C12, полученного в примере 2, с помощью компьютерного моделирования антител, конструировали аминокислотные мутации в соответствии с моделью и получали последовательности варибельной области антитела 14C12H1L1 (константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи Ig гамма-1, ACCESSION:P01857; константная область легкой цепи представляет собой С-область Ig каппа-цепи, ACCESSION:P01834), представленную далее.

Последовательность ДНК варибельной области тяжелой цепи: (354 п. о.).

GAGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGCGGGTCACTGCGACT
GAGCTGCGCAGCTTCCGGATTTCGCTTTAGCTCCTACGACATGTCTGGGTGCGACAGGCACCA
GGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCTACTATCTCAGGAGGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACA
GCGTCAAGGGCCGGTTCAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAA
CAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTT
GCCTATTGGGGGAGGGAACCTGGTGACAGTCTCTAGT (SEQ ID NO: 5)

Закодированная последовательность белка: (118 а. к.).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYTY
YPDSVKGRFTISRDNKNNLYLQMNLSRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTIVTSS

(SEQ ID NO: 6)

Последовательность ДНК варибельной области легкой цепи: (321 п. о.).

GACATTGAGATGACTCAGAGCCCTCCTCCATGTCCGCTCTGTGGGCGACAGGGTCAC
CTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGG
AAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCA
GTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCTGAGGACATGGC
AACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAACCTGGAG
CTGAAG (SEQ ID NO: 7)

Закодированная последовательность белка: (107 а. к.).

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVP

SRFSGSGSGQDYTLTISSLPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 8)

Пример 4. Получение и электрофорез SDS-PAGE гуманизированного моноклонального антитела 14C12H1L1.

Отдельно клонировали кДНК тяжелой цепи (последовательность варибельной области представляет собой SEQ ID NO: 5, константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи Ig гамма-1, ACCESSION: P01857) и кДНК легкой цепи (последовательность варибельной области представляет собой SEQ ID NO 7: константная область легкой цепи представляет собой С-область Ig каппа-цепи, ACCESSION: P01834) 14C12H1L1 в вектор pUC57simple (предоставленный GenScript Biotech Corp.) (сайты ферментативного расщепления: XbaI и BamHI) для получения плазмиды pUC57simple-14C12H1 и pUC57simple-14C12L1 соответственно. Эти плазмиды субклонировали в вектор pcDNA3.1 соответственно (сайты ферментативного расщепления: XbaI и BamHI), экстрагировали обе рекомбинантные плазмиды и котрансфицировали клетки 293F.

Через 7 суток культивирования клеток культуру клеток центрифугировали посредством высокоскоростного центрифугирования и фильтровали путем вакуумной фильтрации через микропористую мембрану и загружали в колонку HiTrap MabSelectSuRe, а затем антитело элюировали с помощью буфера для элюции за один этап, а затем пропускали через колонку для обессоливания HiTrap и вымыли в буфер PBS, а далее очистили для получения рекомбинантного антитела 14C12H1L1, которое анализировали электрофорезом SDS-PAGE.

Результаты показаны на фиг. 1, восстановленный целевой белок появился приблизительно при 24,5 и 49 кДа, а невосстановленный целевой белок появился приблизительно при 147 кДа.

Пример 5. Измерения кинетических параметров антител.

Кинетику связывания антитела 14C12 и гуманизированного антитела 14C12H1L1 с антигеном PD1 измеряли с помощью системы Fortebio Octet.

1. Расщепляли белок PD1-mFc протеазой TEV и получали антиген PD1 путем очистки на колонке.

2. Антиген PD1 (концентрация 1 мкг/мл), меченный биотином, иммобилизовали на поверхности сенсора SA и уравнивали в буфере PBST, а затем связывали антитела 14C12, 14C12H1L1 и 5C4, и антитела были разбавлены в каждом разведении в три раза относительно предыдущей концентрации начиная с 200 нМ. Диссоциацию антигена и антитела также проводили в PBST.

Кинетика связывания антител 14C12, 14C12H1L1 и 5C4 показана в табл. 1 и на фиг. 2, 3 и 4 соответственно. Результаты показали, что как 14C12, так и 14C12H1L1 имеют хорошую аффинность с PD1 с более высокой аффинностью, чем у 5C4.

Таблица 1

Динамические параметры антитела 14C12.

Название антитела	K_D (М)	K_{on} (1/мс)	Ошибка K_{on}	K_{dis} (1/с)	Ошибка K_{dis}
14C12	1,81E-11	3,38E+05	8,23E+03	6,12E-06	1,04E-05
14C12H1L1	2,42E-11	3,17E+05	5,90E+03	7,66E-06	8,70E-06
5C4	6,46E-10	5,63E+05	1,38E+04	3,63E-04	9,77E-06

K_D : константа диссоциации;

K_{on} : скорость связывания антигена и антитела;

K_{dis} : скорость диссоциации антигена и антитела;

$K_D = K_{dis}/K_{on}$.

Пример 6. Активность связывания антитела и антигена PD1, измеренная с помощью опосредованного ИФА.

Активности связывания антител 14C12H1L1 и 5C4 с PD1 измеряли отдельно с помощью опосредованного ИФА следующим образом.

После инкубации с PD1-mFc при 4°C в течение ночи микропланшет блокировали 1% БСА при 37°C в течение 2 ч, а затем антитела добавляли по отдельности и инкубировали при 37°C в течение 30 мин,

затем добавляли меченное HRP (пероксидаза хрена) вторичное антитело (козий анти-человеческий IgG (H+L)) (Jackson, 109-035-088) и затем добавляли TMB (Neogen, 308177) для прохождения реакции в течение 5 мин и измеряли оптическую плотность при длине волны, равной 450 нм, в считывающем устройстве для микропланшетов.

Результаты связывания антител 14C12H1L1 и 5C4 с антигеном PD1 показаны на фиг. 5. Как показано на фиг. 5, оба антитела 14C12H1L1 и 5C4 могут эффективно связываться с белком PD1 с зависимостью от дозы. Интенсивности поглощения при разных дозах показаны в табл. 2. С помощью моделирования кривой с использованием результатов количественного анализа в виде значений оптической плотности было определено, что EC50 связывания 14C12H1L1 и 5C4 с PD1 определены равными 0,032 и 0,043 нМ соответственно.

Таблица 2

Интенсивности поглощения для связывания 14C12H1L1 и 5C4 с PD1

Концентрация антитела (мкг/мл)	Антигенное покрытие: PD1-mFc (0,5 мкг/мл)			
	14C12H1L1		5C4	
1	2,970	2,954	2,959	2,991
0,3	2,886	2,961	2,978	3,079
0,1	2,864	2,868	2,838	2,926
0,03	2,674	2,669	2,617	2,659
0,01	2,222	2,201	1,981	2,221
0,003	1,383	1,464	1,169	1,222
0,001	0,676	0,736	0,527	0,548
0	0,062	0,062	0,065	0,073
Вторичное антитело	Меченное HRP вторичное антитело (козий анти-человеческий IgG)			

Пример 7. Активности связывания антител с антигеном PD1 против PDL1, определенные с помощью конкурентного ИФА.

Активности связывания гуманизированных антител 14C12H1L1 и 5C4 с антигеном PD1 против PDL1 измеряли с помощью конкурентного ИФА следующим образом.

После инкубации с PD1-hFc при 4°C в течение ночи микропланшет блокировали 1% БСА в течение 2 ч, антитела 14C12H1L1 и 5C4 с различными концентрациями (см. табл. 3 для разведенных концентраций) смешивали с PDL1-mFc в течение 10 мин, и смеси инкубировали при 37°C в течение 30 мин, а затем добавляли соответствующие анти-человеческие и анти-мышинные меченые ферментом вторичные антитела соответственно и инкубировали при 37 °C в течение 30 мин. Поглощение на длине волны 450 нм считывали в считывающем устройстве для микропланшетов.

Результаты связывания антител 14C12H1L1 и 5C4 с антигеном PD1 показаны на фиг. 6. Как показано на фиг. 6, антитело 14C12H1L1 может конкурировать с PDL1 и эффективно связываться с белком PD1 с зависимостью от дозы. Интенсивности поглощения при разных дозах показаны в табл. 3. С помощью моделирования кривой с использованием результатов количественного анализа в виде значений поглощения было определено, что EC50 активности связывания 14C12H1L1 и 5C4 составляет 1,322 и 1,199 нМ соответственно.

Таблица 3

Конкурентное связывание 14C12H1L1 и 5C4 с PD1 против PDL1

Антигенное покрытие	PD1-mFc 0,5 мкг/мл			
Концентрация антитела/градиент разведения	14C12H1L1		5C4	
1,5 мкг/мл	0,062	0,064	0,070	0,075
1:3	0,069	0,064	0,081	0,086
1:9	0,363	0,305	0,372	0,269
1:27	1,727	1,543	1,429	1,604
1:81	1,892	1,752	1,766	1,881

1:243	1,984	2,029	2,045	2,005
1:729	1,937	1,978	1,934	1,954
0	1,870	1,977	1,933	1,977
Лиганд	PDL1-mFc 0,3 мкг/мл			
Вторичное антитело	Меченное HRP козье анти-мышинное вторичное антитело			

Пример 8. Активность связывания антител с антигеном PD1 поверхности клеток методом проточной цитометрии.

Были сконструированы клетки-хозяева 293Т, экспрессирующие антиген PD1, и помечены гуманизированным антителом 14C12H1L1, полученным согласно данному изобретению (см. пример 4). Способность антитела 14C12H1L1 специфически связываться с антигеном клеточной поверхности в его нативной конформации анализировали и проверяли с помощью проточной цитометрии.

1. Конструирование клетки-хозяина 293Т, экспрессирующей антиген PD1.

Конкретные шаги были следующими.

Конструирование клетки-хозяина 293Т, экспрессирующей антиген PD1.

Клетки 293Т трансфицировали PD1-содержащим вектором pLenti6.3-PD1 (вектор pLenti6.3 был приобретен у Invitrogen Corporation) в соответствии с руководством набора Lipofectamin Transfection Kit (приобретенным у Invitrogen Corporation) для получения стабильного пула 293Т-PD1, экспрессирующих PD1, путем скрининга.

2. Связывание антител с антигеном клеточной поверхности 293Т-PD1.

Мечение антител и проточная цитометрия.

Полученный вышеописанным этапом 293Т-PD1 расщепляли трипсином и распределяли по пробиркам, каждая из которых содержала 2×10^5 клеток. Антитела PD1 разбавляли с использованием буфера PBS (1% BCA) в концентрациях 50, 10, 5, 1, 0,1 и 0,01 нМ и добавляли в пробирки и инкубировали на льду с экспрессирующими PD1 клетками 293Т в течение 2 ч. В каждую пробирку добавляли 100 мкл FITC-меченого вторичного козьего анти-человеческого антитела (1:500) и инкубировали на льду в течение 1 ч. После 3-кратной промывки с помощью PBS клетки ресуспендировали в 300 мкл PBS и измеряли сигналы флуоресценции на проточном цитометре с использованием канала FITC.

Результаты связывания гуманизированного антитела 14C12H1L1 с клетками 293Т-PD1 показаны на фиг. 7. Как показано на фиг. 7, антитело 14C12H1L1 может эффективно связывать целевой белок PD1, экспрессирующийся на поверхности клеток-хозяев 293Т-PD1, с зависимостью от дозы. Интенсивности флуоресценции при разных дозах показаны в табл. 4. Через моделирование кривой с использованием результатов количественного анализа в виде значений интенсивности флуоресценции, EC50 связывания 14C12H1L1 с PD1 было определено как 1,89 нМ.

Таблица 4

Интенсивности флуоресценции связывания 14C12H1L1 с поверхностным антигеном 293Т-PD1, обнаруженные методом проточной цитометрии

Концентрация (нМ)	0,01	0,1	1	5	10	50
Интенсивность флуоресценции	8,32	20,31	174,62	579,41	686,49	669,54

Пример 9. Активность связывания антитела с поверхностным антигеном PD1 Т-клеток методом проточной цитометрии.

PBMC были выделены при помощи Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, партия № 171440-02), затем выделяли клетки CD4⁺ и клетки стимулировали PHA (фитогемагглютинином) (Shanghai Shenqi Biotech Co., Ltd, 50 мкл/мл) в течение трех суток, а затем один раз промывали PBS и антитела в различных концентрациях добавляли и инкубировали на льду в течение 1,5 ч. Затем клетки промывали PBS один раз после инкубации, добавляли меченное FITC козье анти-человеческое вторичное антитело (Jackson immunoresearch lot. 102155), инкубировали на льду в темноте в течение 1 ч и после однократного промывания PBS сигналы флуоресценции измеряли на проточном цитометре.

Результаты связывания гуманизированного антитела 14C12H1L1 с Т-клетками показаны на фиг. 8. Очевидно, что антитело 14C12H1L1 может эффективно связывать белок PD1 на поверхности Т-клеток с зависимостью от дозы.

Пример 10. Реакция смешанных лимфоцитов.

Секреция цитокинов ИФН- γ , ИЛ-2 PBMC были выделены при помощи Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, партия № 171440-02), дополнительно выделенные PBMC индуцировали ИЛ-4 (Peprotech K2513, 1000 ед/мл) и GM-CSF (Peprotech H1513, 1000 ед/мл) в течение 6 суток, а затем ФНО- α (Peprotech G1513, 200 ед/мл) был добавлен для индукции в течение 3 суток для получения клеток DC (дендритных клеток).

Т-клетки выделяли из РВМС и смешивали с клетками DC, полученными выше, в соотношении 10:1 для совместного культивирования с антителами 14C12H1L1, 5C4 и hIgG (hIgG в качестве изотипического контроля) в различных соотношениях в течение 5-6 суток. Значения секреции ИФН- γ и ИЛ-2 измеряли с помощью соответствующих наборов реагентов для ИФА (оба были приобретены у Dakewe) соответственно.

Секреции ИФН- γ и ИЛ-2 после смешивания культуры клеток DC и Т-клеток были показаны на фиг. 9 и 10. Антитело 14C12H1L1 может эффективно индуцировать секрецию ИФН- γ и ИЛ-2 с зависимостью от дозы. Антитело 14C12H1L1 может индуцировать более высокую секрецию как ИФН- γ , так и ИЛ-2, чем контрольное антитело 5C4.

Пример 11. Индуцированная секреция ИЛ-2.

Выделенные РВМС (такой же метод, как в примере 10) стимулировали с помощью РНА (Shanghai Shenqi Biotech Co., Ltd, 50 мкл/мл) в течение 3 суток, а затем зрелые РВМС (5×10^4 клеток/лунка) смешивали с клетками Raji (Китайская академия наук Шанхайский филиал) (5×10^4 клеток/лунка) и клетками MDA-MB-231 (ATCC) (1×10^4 клеток/лунка) в 96-луночном планшете. Добавляли 100 нМ 14C12H1L1 или контрольного антитела 5C4 или hIgG (hIgG в качестве изотипического контроля), смешивали и культивировали вместе в течение 3 суток. Секрецию ИЛ-2 определяли с помощью набора реагентов для ИФА (приобретенного у Dakewe) в соответствии с инструкциями для набора.

Результаты секреции ИЛ-2 после инкубации смешанной клеточной культуры показаны на фиг. 11. Как показано на фиг. 11, антитело может эффективно индуцировать РВМС к секреции ИЛ-2, а секреция ИЛ-2, индуцированная 14C12H1L1, значительно выше, чем секреция для контрольного антитела 5C4.

Пример 12. Влияние антитела 14C12H1L1 на рост опухоли в модели опухоли MC38 у мышей PD-1 HuGEMM.

Опухолевые клетки MC38 (1×10^6 клеток/мышь) инокулировали подкожно в правый бок мышей PD-1 HuGEMM (трансгенных мышей с PD-1 человека). Когда средний объем опухоли достиг приблизительно 118 мм³, мышей случайным образом разделили на 4 экспериментальные группы по 8 мышей в каждой группе. Антитела давали введением через брюшную полость. Конкретные группы и дозировки были следующими:

- группа изотипического контроля (доза: 8 мг/кг),
- 14C12H1L1 группа с высокой дозой (доза: 8 мг/кг),
- 14C12H1L1 группа с низкой дозой (доза: 0,8 мг/кг),
- группа ниволумаба (доза: 8 мг/кг).

Вышеуказанным 4 группам вводили антитела два раза в неделю, всего 5 доз. После инъекции размеры опухолей измеряли два раза в неделю.

Результаты предоставлены на фиг. 12.

Результаты указывают на то, что статистически размеры опухолей в группе ниволумаба, группе с высокой дозой 14C12H1L1 и группе с низкой дозой 14C12H1L1 были значимо меньше, чем в группе изотипического контроля ($P < 0,01$, $P < 0,01$, $P < 0,05$ соответственно). Группа с высокой дозой 14C12H1L1 (8 мг/кг) продемонстрировала статистически значимый противоопухолевый эффект на модели опухоли MC38 у мышей PD-1 HuGEMM и имела эффективность, эквивалентную одобренному препарату для той же мишени - ниволумабу (8 мг/кг).

Хотя конкретные варианты осуществления данного изобретения были описаны подробно, как будет понятно специалисту в данной области техники, эти детали могут повлечь за собой различные модификации и замены в соответствии со всеми раскрытыми нами принципами. Все эти изменения охватываются объемом данного изобретения. Полный объем данного изобретения охватывается прилагаемой формулой изобретения и любыми эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Анти-PD-1 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где
 - вариабельная область тяжелой цепи (V_H) моноклонального антитела содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 9-11; и
 - вариабельная область легкой цепи (V_L) моноклонального антитела содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 12-14.
2. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где
 - аминокислотная последовательность V_H моноклонального антитела выбрана из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 6; и
 - аминокислотная последовательность V_L моноклонального антитела выбрана из SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 8.
3. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит V_H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 и V_L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4.
4. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, где моноклональное

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит V_H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6 и V_L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8.

5. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, CDR-фрагмент или одноцепочечное антитело (scFv).

6. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где аффинность связывания (K_D) с PD1 моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет менее чем 10^{-5} M.

7. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где аффинность связывания (K_D) с PD1 моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента составляет 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} или 10^{-10} M или менее.

8. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6 или 7, где K_D измеряют анализатором молекулярных взаимодействий ForteBio.

9. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пп.1-4, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит области, отличные от CDR, полученные от вида, отличного от мыши.

10. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.9, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит области, отличные от CDR, полученные от человека.

11. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируется линией клеток гибридомы LT003 и линия клеток гибридомы LT003 депонирована в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) с депозитарным номером доступа CCTCC: C2015105.

12. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи (V_H) моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.1, где V_H содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 9-11.

13. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.12, где V_H содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6.

14. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.13, где молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5.

15. Экспрессионный конструкт, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.12-14.

16. Экспрессионный конструкт по п.15, где экспрессионный конструкт дополнительно содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или экспрессионный конструкт, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи (V_L) моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.1, где V_L содержит CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 12-14.

17. Экспрессионный конструкт по п.16, где V_L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 8.

18. Экспрессионный конструкт по п.17, где нуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область легкой цепи (V_L) моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.1 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 7.

19. Экспрессионная линия клеток, содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.12-14 или экспрессионный конструкт по любому из пп.15-18.

20. Линия клеток гибридомы LT003, депонированная в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) с депозитарным номером доступа CCTCC: C2015105, для получения анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11.

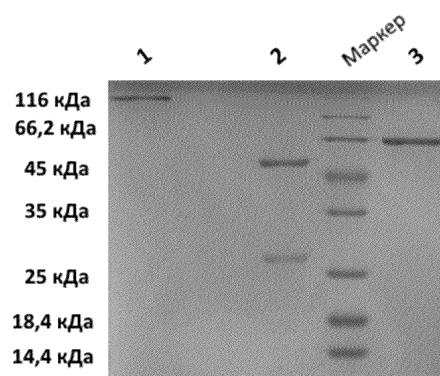
21. Конъюгат, содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающие фрагмент по любому из пп.1-11 и партнер для конъюгирования в качестве детектируемого маркера.

22. Конъюгат по п.21, где партнер для конъюгирования представляет собой радиоактивные изотопы, флуоресцеин, люминесцентное вещество, красители или ферменты.

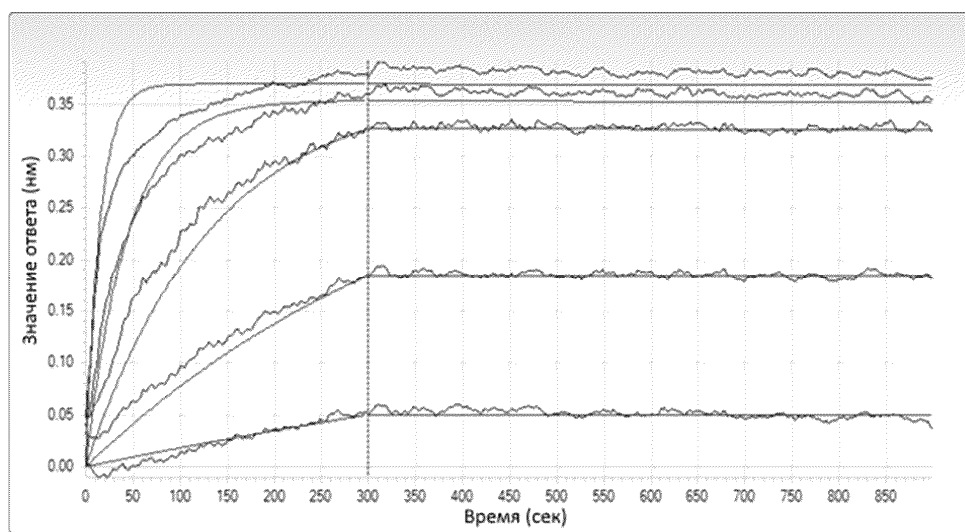
23. Фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11 либо конъюгат по п.21 или 22 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

24. Применение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по пп.1-11, или конъюгата по п.21 или 22, или фармацевтической композиции по п.23 для лечения опухолей.

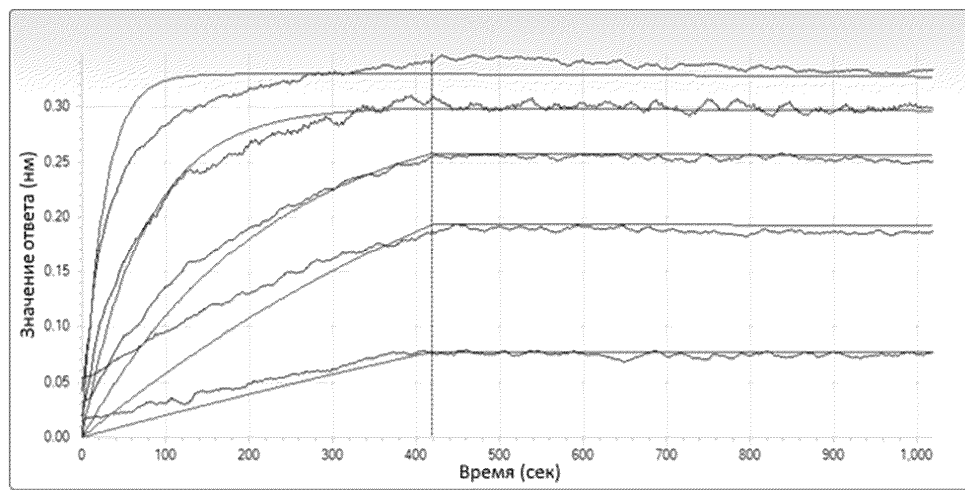
25. Применение по п.24, где опухоли представляют собой меланому, рак почки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак печени, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника и лейкоз.



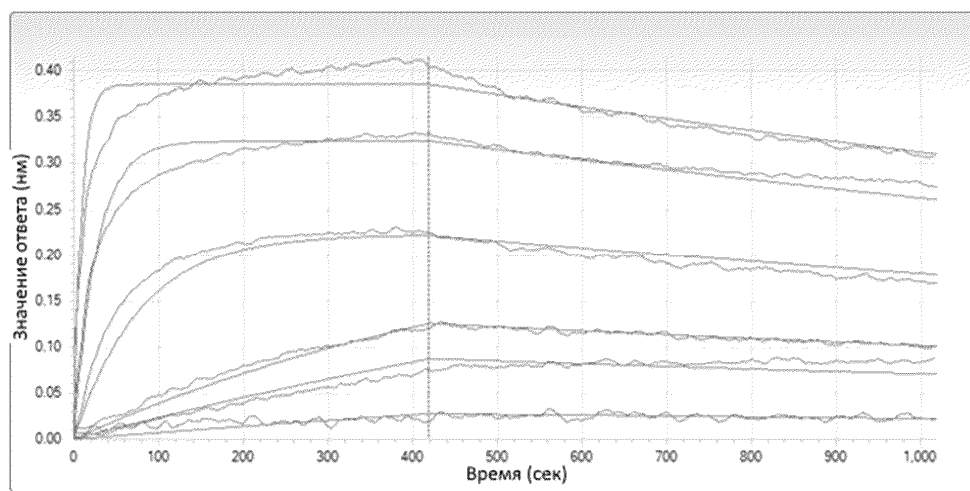
Фиг. 1



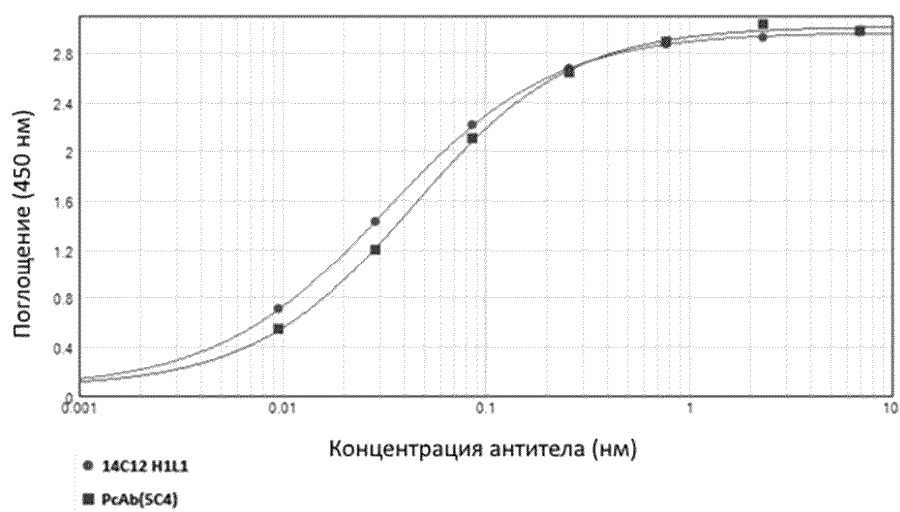
Фиг. 2



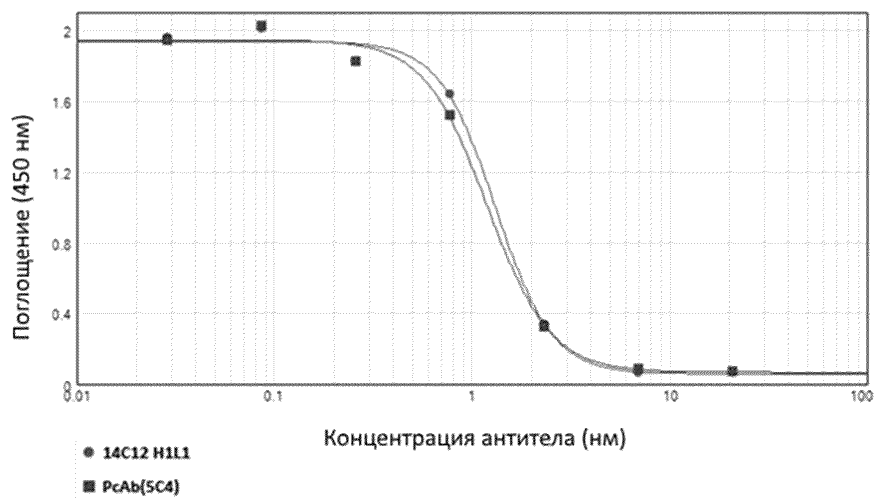
Фиг. 3



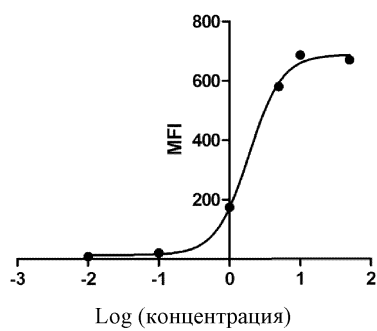
Фиг. 4



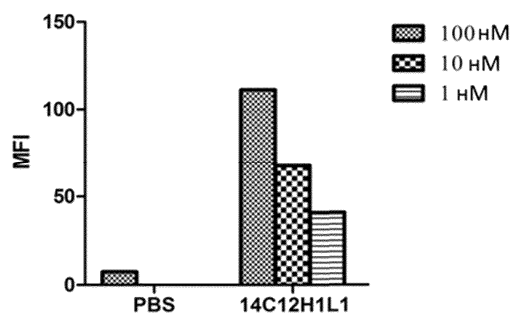
Фиг. 5



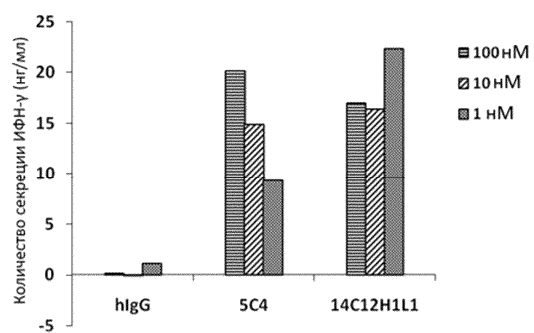
Фиг. 6



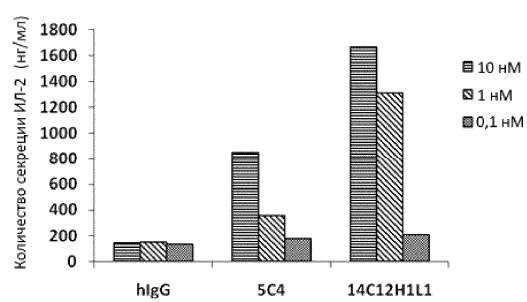
Фиг. 7



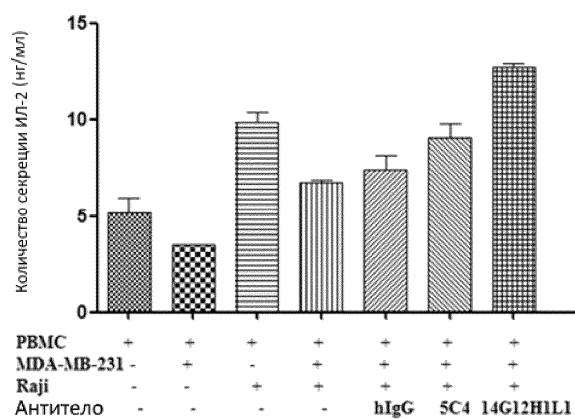
Фиг. 8



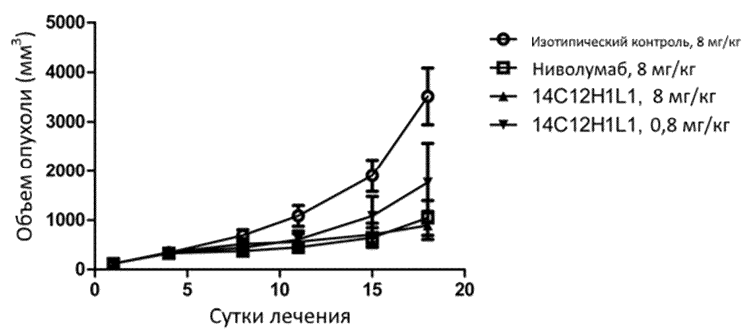
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2