

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391453** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.07.25

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2013.09.13

(54) **АНТИТЕЛА К PD1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ И
ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ**

(62) **201992798; 2013.09.13**

(71) Заявитель:
**БЕЙДЖИН СВИТЗЕРЛАНД ГМБХ
(CN)**

(72) Изобретатель:
**Сун Цзин, Ли Кан, Чжан Тун, Сюй
Ланьлань, Лю Ци, Пэн Хао (CN)**

(74) Представитель:
**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)**

(57) Предложены антитела, которые специфично связываются с белком программируемой смерти-1 (PD-1, Pdc1 или CD279) и ингибируют PD1-опосредованную клеточную сигнализацию и активности в клетках иммунной системы, антитела связываются с набором аминокислотных остатков, необходимых для связывания его лиганда, и применение данных антител для лечения или диагностики рака, инфекционных заболеваний или других патологических расстройств, модулируемых PD1-опосредованными функциями.

A1

202391453

202391453

A1

АНТИТЕЛА К PD1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

ВВЕДЕНИЕ

Белок программируемой смерти-1 (PD-1, также называемый CD279) представляет собой 55 кДа рецепторный белок, связанный с семейством соstimулирующих/ингибирующих рецепторов CD28/CTLA4 (Blank et al., 2005 *Cancer Immunol Immunother* 54:307-314). Гены и кДНК, кодирующие PD-1, были клонированы и охарактеризованы у мыши и человека (Ishida et al., 1992 *EMBO J* 11:3887-3395; Shinohara et al., 1994 *Genomics* 23:704-706). Полноразмерный PD-1 содержит 288 аминокислотных остатков (учетный номер NCBI: NP_005009). Его внеклеточный домен состоит из аминокислотных остатков 1-167, и цитоплазматический С-концевой хвост содержит остатки 191-288, который имеет два гипотетических иммунорегуляторных мотива, иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM; Vivier et al., 1997 *Immunol Today* 18:286-291) и иммунорецепторный тирозиновый мотив переключения (ITSM; Chemnitz et al., 2004 *J Immunol* 173:945-954).

К настоящему времени идентифицированы два родственных по последовательности лиганда, PD-L1 (B7-H1) и PD-L2 (B7-DC), которые специфично взаимодействуют с PD-1, индуцируя внутриклеточную сигнальную трансдукцию, которая ингибирует CD3 и CD28-опосредованную активацию Т-клеток (Riley, 2009 *Immunol Rev* 229:114-125), что, в свою очередь, ослабляет активности Т-клеток, например, снижение пролиферации клеток, выделение IL-2 (Интерлейкин-2) и IFN- γ (интерферон-гамма), а также выделение других факторов роста и цитокинов.

Экспрессию PD-1 часто обнаруживали в таких клетках иммунной системы, как Т-клетки, В-клетки, моноциты и NK-клетки (натуральные киллеры). Он редко экспрессировался в других тканях человека, таких как мышечные, эпителиальные, нервные ткани и т.д. Кроме того, высокий уровень экспрессии PD-1 часто ассоциирован с активацией клеток иммунной системы. Например, когда линию Т-клеток человека, Jurkat, активировали фитогемагглютинином (ФГА) или сложным форболовым эфиром (12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат или ТФА), экспрессия PD-1 заметно повышалась в Вестерн-блоттинге (Vibharka et al., 1997 *Exp Cell Res* 232:25-28). Такое же явление наблюдали в стимулированных мышинных Т- и В-лимфоцитах и первичных Т-клетках CD4⁺ человека при стимуляции антителом против CD3 (Agata et al., 1996 *Int Immunol* 8:765-772; Bennett et al., 2003 *J Immunol* 170:711-118). Повышение экспрессии PD-1 с последующей стимуляцией эффекторных Т-клеток способствует истощению

активированных эффекторных Т-клеток и снижению иммунной активности. Таким образом, PD-1-опосредованный ингибиторный сигнал играет важную роль в иммунологической толерантности (Bour-Jordan et al., 2011 *Immunol Rev* 241:180-205).

О повышении уровня экспрессии PD-1 в лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль (TIL), и экспрессии лиганда PD-1 в опухолевых клетках сообщалось при множестве раковых заболеваний, встречающихся в разных типах тканей и органов, таких как легкое (Konishi et al., 2004 *Clin Cancer Res* 10:5094-5100), печень (Shi et al., 2008 *Int J Cancer* 128:887-896; Gao et al., 2009 *Clin Cancer Res* 15:971-979), желудок (Wu et al., 2006 *Acta Histochem* 108:19-24), почка (Thompson et al., 2004 *Proc Natl Acad Sci* 101:17174-17179; Thompson et al., 2007 *Clin Cancer Res* 13:1757-1761), молочная железа (Ghebeh et al., 2006 *Neoplasia* 8:190-198), яичник (Hamanishi et al., 2007 *Proc Natl Acad Sci* 104:3360-3365), поджелудочная железа (Nomi et al., 2007 *Clin Cancer Res* 13:2151-2157), меланоциты (Hino et al., 2010 *Cancer* 116:1757-1766) и пищевод (Ohigashi et al., 2005 *Clin Cancer Res* 11:2947-2953). Чаще, повышенная экспрессия PD-1 и PD-L1 при этих раковых заболеваниях ассоциирована с неблагоприятным прогнозом в отношении выживаемости пациента. Исследования трансгенных мышей с нокаутом гена PD-1, ингибирующим рост ксенотрансплантатных опухолевых клеток, дополнительно пролили свет на значимость PD-1 сигнализации в модуляции иммунной системы для уничтожения раковых клеток или толерантности к ним (Zhang et al., 2009 *Blood* 114:1545-1552).

Позитивная регуляция PD-1 сигнализации приводит к иммунологической толерантности не только в отношении роста раковой опухоли, но также в отношении инфицирования и распространения вируса у человека. Преобладающие вирусные инфекции печени, HBV (вирус гепатита В) и HCV (вирус гепатита С), вызывают сверхэкспрессию лигандов PD-1 в гепатоцитах и активируют PD-1 сигнализацию в эффекторных Т-клетках, приводя к Т-клеточному истощению и толерантности к вирусной инфекции (Boni et al., 2007 *J Virol* 81:4215-4225; Golden-Mason et al., 2008 *J Immunol* 180:3637-3641). Так, инфекция HIV (вирус иммунодефицита человека) часто уклоняется от воздействия иммунной системы человека посредством похожих механизмов. Терапевтическая модуляция PD-1 сигнализации посредством молекул антагонистов может нивелировать иммунологическую толерантность и стимулировать клетки иммунной системы для борьбы с раком и хронической вирусной инфекцией (Blank et al., 2005 *Cancer Immunol Immunother* 54:307-314; Okazaki et al., 2007 *Int Immunol* 19:813-824).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно изобретению предложены способы и композиции для иммунного ингибирования PD-1. В одном аспекте изобретения предложен антигенсвязывающий фрагмент антитела, который специфично связывается с PD-1 человека и содержит определяющую комплементарность область (CDR), имеющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO 11-22, 31-42 и 59-63.

CDR подвержены рекомбинации в варибельной области тяжелой цепи (Vh) и варибельной области легкой цепи (Vk), которые содержат (CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) и (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3) последовательности, соответственно, и сохраняют PD-1-специфичное связывание и/или функциональность.

В конкретных воплощениях домен содержит варибельную область тяжелой цепи (Vh) или варибельную область легкой цепи (Vk), содержащую:

а) CDR-H1 (SEQ ID NO:11, 17, 31 или 37), б) CDR-H2 (SEQ ID NO:12, 18, 32 или 38), в) CDR-H3 (SEQ ID NO:13, 18, 33 или 39);	г) CDR-L1 (SEQ ID NO:14, 20, 34 или 40), д) CDR-L2 (SEQ ID NO:15, 21, 35 или 41) или е) CDR-L3 (SEQ ID NO:16, 22, 36 или 42).
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

В конкретных воплощениях домен содержит варибельную область тяжелой цепи (Vh) и/или варибельную область легкой цепи (Vk), содержащие:

а) mu317	CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3	(SEQ ID NO:11-13); (SEQ ID NO:14-16);
б) mu326	CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3	(SEQ ID NO:17-19); (SEQ ID NO:20-22);
в) 317-4B6	CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3	(SEQ ID NO:31-33); (SEQ ID NO:34-36);
г) 326-4A3	CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3	(SEQ ID NO:37-39); (SEQ ID NO:40-42);
д) 317-1	CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3	(SEQ ID NO:11, 59, 13); (SEQ ID NO:14-16);
е) 317-4B2	CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3	(SEQ ID NO:11, 60, 13); (SEQ ID NO:61, 15, 16);
ж) 317-4B5	CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3	(SEQ ID NO:11, 60, 13); (SEQ ID NO:61, 15, 16);
з) 317-4B6	CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3	(SEQ ID NO:11, 32, 13); (SEQ ID NO:61, 15, 16);

- и) 326-1 CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 (SEQ ID NO:17, 62, 19);
 CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 (SEQ ID NO:20-22);
- к) 326-3B1 CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 (SEQ ID NO:17, 62, 19);
 CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 (SEQ ID NO:20-22);
- л) 326-3G1 CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 (SEQ ID NO:17, 62, 19); или
 CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 (SEQ ID NO:20-22).

В конкретных воплощениях домен содержит переменную область тяжелой цепи (Vh) и переменную область легкой цепи (Vk), содержащие:

(а) CDR-H1 (SEQ ID NO 31), CDR-H2 (SEQ ID NO 12, 32, 59 или 60) и CDR-H3 (SEQ ID NO 33),

CDR-L1 (SEQ ID NO 14, 34 или 61), CDR-L2 (SEQ ID NO 35) и CDR-L3 (SEQ ID NO 36); или

(б) CDR-H1 (SEQ ID NO 37), CDR-H2 (SEQ ID NO 18, 38 или 62) и CDR-H3 (SEQ ID NO 39),

CDR-L1 (SEQ ID NO 40), CDR-L2 (SEQ ID NO 41) и CDR-L3 (SEQ ID NO 42).

В конкретных воплощениях домен содержит переменную область тяжелой цепи (Vh) или переменную область легкой цепи (Vk), содержащую:

а) mu317 (SEQ ID NO:4 или 6);	р) 317-3H1 (SEQ ID NO:69);
б) mu326 (SEQ ID NO:8 или 10);	с) 317-3I1 (SEQ ID NO:70);
в) 317-4B6 (SEQ ID NO:24 или 26);	т) 317-4B1 (SEQ ID NO:71);
г) 326-4A3 (SEQ ID NO:28 или 30);	у) 317-4B3 (SEQ ID NO:72);
д) 317-4B2 (SEQ ID NO:43 или 44);	ф) 317-4B4 (SEQ ID NO:73);
е) 317-4B5 (SEQ ID NO:45 или 46);	х) 317-4A2 (SEQ ID NO:74);
ж) 317-1 (SEQ ID NO:48 или 50);	ц) 326-3A1 (SEQ ID NO:75);
з) 326-3B1 (SEQ ID NO:51 или 52);	ч) 326-3C1 (SEQ ID NO:76);
и) 326-3G1 (SEQ ID NO:53 или 54);	ш) 326-3D1 (SEQ ID NO:77);
к) 326-1 (SEQ ID NO:56 или 58);	э) 326-3E1 (SEQ ID NO:78);
л) 317-3A1 (SEQ ID NO:64);	ю) 326-3F1 (SEQ ID NO:79);
м) 317-3C1 (SEQ ID NO:65);	я) 326-3B N55D (SEQ ID NO:80);
н) 317-3E1 (SEQ ID NO:66);	аа) 326-4A1 (SEQ ID NO: 81); или
о) 317-3F1 (SEQ ID NO:67);	аб) 326-4A2 (SEQ ID NO: 82).
п) 317-3G1 (SEQ ID NO:68);	

В конкретных воплощениях домен содержит переменную область тяжелой цепи (Vh) и переменную область легкой цепи (Vk), содержащие:

а) mu317 (SEQ ID NO:4 и 6);	р) 317-3H1 (SEQ ID NO:69 и 26);
б) mu326 (SEQ ID NO:8 и 10);	с) 317-3I1 (SEQ ID NO:70 и 26);
в) 317-4B6 (SEQ ID NO:24 и 26);	
г) 326-4A3 (SEQ ID NO:28 и 30);	т) 317-4B1 (SEQ ID NO:71 и 26);
д) 317-4B2 (SEQ ID NO:43 и 44);	у) 317-4B3 (SEQ ID NO:72 и 26);
е) 317-4B5 (SEQ ID NO:45 и 46);	ф) 317-4B4 (SEQ ID NO:73 и 26);
ж) 317-1 (SEQ ID NO:48 и 50);	х) 317-4A2 (SEQ ID NO:74 и 26);
з) 326-3B1 (SEQ ID NO:51 и 52);	ц) 326-3A1 (SEQ ID NO:75 и 30);
и) 326-3G1 (SEQ ID NO:53 и 54);	ч) 326-3C1 (SEQ ID NO:76 и 30);
к) 326-1 (SEQ ID NO:56 и 58);	ш) 326-3D1 (SEQ ID NO:77 и 30);
л) 317-3A1 (SEQ ID NO:64 и 26);	э) 326-3E1 (SEQ ID NO:78 и 30);
м) 317-3C1 (SEQ ID NO:65 и 26);	ю) 326-3F1 (SEQ ID NO:79 и 30);
н) 317-3E1 (SEQ ID NO:66 и 26);	я) 326-3B N55D (SEQ ID NO:80 и 30);
о) 317-3F1 (SEQ ID NO:67 и 26);	аа) 326-4A1 (SEQ ID NO:28 и 81); или
п) 317-3G1 (SEQ ID NO:68 и 26);	аб) 326-4A2 (SEQ ID NO:28 и 82).

В конкретных воплощениях домен специфично связывается с остатками PD1: (а) K45 и I93 (нумерация AA (аминокислотных остатков) на основе 2008 PNAS, 105:10483; что соответствует K58 и I106 в SEQ ID NO 2); или (б) I93, L95 и P97(нумерация AA на основе 2008 PNAS, 105:10483; что соответствует I106, L108 и P110 в SEQ ID NO 2).

В конкретных воплощениях домен индуцирует высвобождение IL-2 в клетках HuT78/PD-1, совместно культивируемых с клетками HEK293/OS8/PD-L1 или с клетками EK293/OS8/PD-L2, и/или ингибирует выделение IL-2 в клетках HuT78/P3Z, совместно культивируемых с клетками HEK293/PD-L1 или с клетками HEK293/PD-L2.

Согласно изобретению также предложен эффектор тяжелой цепи или константный домен антитела IgG4, содержащий любую из SEQ ID NO:83-88, в частности SEQ ID NO 87 или 88.

Согласно изобретению также предложены антитела, F(ab) или F(ab)₂, содержащие заявленный PD-1-связывающий домен.

Согласно изобретению также предложены антитела, содержащие заявленный PD-1-связывающий домен и эффектор тяжелой цепи или константный домен IgG4, содержащий любую из SEQ ID NO:83-88, в частности SEQ ID NO 87 или 88.

Согласно изобретению также предложен полинуклеотид, кодирующий заявленный PD-1-связывающий домен, в частности последовательности кДНК.

Согласно изобретению также предложены способы применения заявленных доменов посредством введения данного домена индивидууму, который, как установлено, имеет рак или вирусную инфекцию, или по иным причинам нуждается в PD-1 антагонизме.

Согласно изобретению также предложены слитые белки, содержащие: (а) одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) моноклонального антитела (mAb) ОКТ3 против человеческого CD3, слитый с С-концевым доменом (113-220) мышинового CD8 α (SEQ ID NO:89); или (б) внеклеточный и трансмембранный домены PD-1 человека, слитые с цитоплазматическим доменом CD3 ζ -цепи человека (SEQ ID NO: 90).

Согласно изобретению также предложены способы применения заявленных слитых белков, включая анализ, скрининг или отбор антител к PD-1 с линией клеток, экспрессирующей слитый белок.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. Схематичное представление PD-1/Fc (сверху) и PD-1/His (снизу). ECD: внеклеточный домен. L: линкер. H: His-метка. Fc: γ 4Fc фрагмент из человеческого IgG4. N: N-конец. C: C-конец.

Фиг. 2. Дозозависимые кривые реакции связывания мышинных mAb с человеческим PD-1 полученные анализом ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ). Мышиные mAb указаны в верхнем левом углу каждой фигуры. MAб 317 и 517 имеют высокую степень гомологии вариабельной области тяжелых и легких цепей. Сила сигнала связывания показана с помощью прямых считываний OD₄₅₀ (оптическая плотность). Покрытие антигеном, PD-1/His, осуществляли в возрастающих концентрациях вплоть до 70 нанограмм на лунку в объеме 50 микролитров. Способ описан в Примере 1.

Фиг. 3. Дозозависимая кривая реакции связывания мышинных mAb с человеческим PD-1, экспрессированным в живых клетках, полученная анализом FACS (сортировка клеток с возбуждением флуоресценции). Коды мышинных антител и EC₅₀ (полумаксимальная эффективная концентрация) указаны на каждой панели. MFI означает среднюю интенсивность флуоресценции. Клетки HuT78/PD-1 суспендировали в 96-луночном планшете при 5 X 10⁴ клеток на лунку для FACS. Связывание mAb против PD-1 с поверхностью клетки-мишени и FACS-детектирование осуществляли, как описано в Примере 1.

Фиг. 4. Схематичное представление систем совместного культивирования клеток, используемых для анализа функциональных активностей mAb против PD-1. Т-клетки (либо CD4⁺, либо CD8⁺) представляют HuT78/PD-1 или первичные Т-клетки в МКПК (моноклеонарные клетки периферической крови). TCR: рецептор Т-клетки. N: ядро. С: цитоплазма.

Фиг. 5. Дозозависимая кривая реакции выделения IL-2, индуцированного мышиными mAb, в клетках HuT78/PD-1, совместно культивируемых с клетками HEK293/OS8/PD-L1. Нижняя кривая: Среднее высвобождение IL-2, индуцируемое mIgG при всех тестируемых концентрациях. Верхняя кривая: Самый высокий уровень высвобождения IL-2 на основе вычисления регрессионным анализом посредством программного обеспечения Prism.

Фиг. 6. (А) Гистограммы, отражающие выделение IFN- γ , индуцированное mAb против PD-1, в МКПК (Донор-19), совместно культивируемых с линией клеток HEK293/OS8/PD-L1. (Б) Гистограммы, показывающие выделение IFN- γ , индуцированное mAb против PD-1, в МКПК (Донор-20), совместно культивируемых с линией клеток HEK293/OS8/PD-L1.

Фиг. 7. (А) и (Б) ADCC (антителозависимая клеточная цитотоксичность) активности mAb против PD-1, определенные посредством совместного культивирования эффекторных клеток (NK92MI/PD-1) и клеток-мишеней (HuT78/PD-1). Средние значения рассчитывали по двум экспериментальным точкам репрезентативных экспериментов. mAb добавляли до концентрации 10 мкг/мл. Эксперимент проводили, как описано в Примере 9.

Фиг. 8. Картирование эпитопов связывания mAb против PD-1 посредством ELISA (верхняя панель) и Вестерн-блоттинга (нижняя панель). Кондиционированные среды, содержащие WT (дикий тип) или Mt PD-1, использовали для оценки активности связывания посредством ELISA и Вестерн-блоттинга. ** показывает AA остатки, mAb активность связывания с которыми снижалась до 25-50% от WT PD-1. *** показывает AA остатки, mAb активность связывания с которыми снижалась до менее чем 25% от WT PD-1.

Фиг. 9. Высвобождение IFN- γ , индуцированное гуманизированными mAb против PD-1, в первичных МКПК человека от разных здоровых доноров, которые культивировали совместно с клетками HEK293/OS8/PD-L1.

Фиг. 10. Цитотоксичность клеток NK92MI/PD-1, усиленная гуманизированными mAb против PD-1, hu317 (А) и hu326 (Б). Клетки-мишени рака легкого, SK-MES-1/PD-L1, культивировали совместно с эффекторными клетками в соотношении (Т и Е) 1 к 2 и анализировали, как описано в Примере 12.

Фиг. 11. Индивидуальные кривые роста опухоли в трех экспериментальных группах, носитель (PBS (фосфатно-солевой буферный раствор)), человеческие IgG (huIgG) и mAb против PD-1 (hu317-1/IgG4mt2). Каждая кривая представляет путь роста опухоли, причем мыши с опухолью обозначены номерами, указанными с правой стороны каждой панели. Клетки Нер3В/OS8/PD-L1 (из линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы Нер3В) засеивали в Сутки 1, МКПК имплантировали в Сутки 15 и три дозы hu317-1/IgG4mt2 инъецировали в Сутки 18, 28 и 38, соответственно. Способы описаны в Примере 12.

ОПИСАНИЕ КОНКРЕТНЫХ ВОПЛОЩЕНИЙ ИЗОБРЕТЕНИЯ

PD-1 инициирует ингибиторную сигнализацию в клетках иммунной системы при взаимодействии со своими лигандами PD-L1 или PD-L2. В случаях разрастания опухоли и вирусной инфекции активация PD-1 сигнализации стимулирует иммунологическую толерантность, приводя к тому, что раковые заболевания или клетки, инфицированные вирусом, избегают иммунологического надзора, и к раковым метастазам или повышению вирусной нагрузки. Ингибирование PD-1-опосредованной клеточной сигнализации терапевтическими агентами может активировать клетки иммунной системы, включая Т-клетки, В-клетки и NK-клетки, и, вследствие этого, усиливать функции клеток иммунной системы, ингибируя рост раковых клеток или вирусную инфекцию, и восстанавливать иммунологический надзор и функцию иммунологической памяти для лечения таких заболеваний человека.

Согласно изобретению предложены антитела, обладающие антагонистическими функциями в отношении лиганд-индуцированной и PD-1-опосредованной клеточной сигнализации в клетках иммунной системы. Мышиные антитела к PD-1 гуманизировали до высокой степени сходства с человеческими антителами в каркасных областях. Полноразмерные антитела, созданные в формате модифицированного варианта человеческого IgG4, имеют уникальный набор черт с точки зрения эффекторных функций и физико-химических свойств. Описанные антитела к PD-1 подходят для применений в терапевтических целях при лечении рака, контроле вирусных инфекций и других заболеваний человека, которые механистически связаны с обостренной иммунологической толерантностью.

Определения

Если в контексте не указано иное, термин «антитело» используется в самом широком смысле и, в частности, охватывает антитела (включая полноразмерные

моноклональные антитела) и фрагменты антител, при условии, что они узнают PD-1. Молекула антитела обычно является моноспецифичной, но также может быть описана как идиоспецифичная, гетероспецифичная или полиспецифичная. Молекулы антител связываются посредством особых сайтов связывания с особыми антигенными детерминантами или эпитопами на антигенах. «Фрагменты антител» содержат часть полноразмерного антитела, обычно его антигенсвязывающую или вариабельную область. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител; и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

Моноклональные антитела (MAb) могут быть получены способами, известными специалистам в данной области. См., например, Kohler et al (1975); Пат. США № 4376110; Ausubel et al (1987-1999); Harlow et al (1988); и Colligan et al (1993). MAb по изобретению могут принадлежать к любому классу иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgE, IgA и любому их подклассу. Гибридом, продуцирующую mAb, можно культивировать *in vitro* или *in vivo*. Высокие титры mAb можно получать при продукции *in vivo*, когда клетки из индивидуальных гибридом вводят мышам внутрибрюшинно, например, мышам Balb/c, обработанных пристаном, с образованием свободной жидкости брюшной полости, содержащей высокие концентрации желаемых mAb. MAb изотипа IgM или IgG могут быть очищены от таких свободных жидкостей брюшной полости или от супернатантов культуры методами колоночной хроматографии, известными в данной области.

Термин «выделенный полинуклеотид» относится к полинуклеотидному участку или фрагменту, который был отделен от последовательностей, которые его фланкируют во встречающемся в природе состоянии, например, фрагменту ДНК, который удаляли из последовательностей, в природе примыкающих к данному фрагменту, например, последовательностей, примыкающих к данному фрагменту в геноме, в котором он встречается в природе. Таким образом, термин включает, например, рекомбинантную ДНК, которая включена в вектор, в автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус или в геномную ДНК прокариота или эукариота, или которая существует в виде отдельной молекулы (например, как кДНК или фрагмент геномной или кДНК, полученный посредством ПЦР (полимеразная цепная реакция) или расщеплением рестриктазой), независимой от других последовательностей. Он также включает рекомбинантную ДНК, которая является частью гибридного гена, кодирующего дополнительную полипептидную последовательность.

Под «конструкцией» подразумевается любая рекомбинантная полинуклеотидная молекула, такая как плазида, космида, вирус, автономно реплицирующаяся

полинуклеотидная молекула, фаг или полинуклеотидная молекула линейной или кольцевой одноцепочечной или двухцепочечной ДНК или РНК, образованная из любого источника, способная к интеграции в геном или автономной репликации, включая полинуклеотидную молекулу, где одна или более чем одна полинуклеотидная молекула связана функциональным образом, то есть функционально связана. Рекомбинантная конструкция будет как правило содержать полинуклеотиды по изобретению, функционально связанные с регуляторными последовательностями инициации транскрипции, которые будут направлять транскрипцию полинуклеотида в намеченной клетке-хозяине. Для направления экспрессии нуклеиновых кислот по изобретению можно использовать как гетерологичные, так и негетерологичные (то есть эндогенные) промоторы.

Термин «вектор» относится к любой рекомбинантной полинуклеотидной конструкции, которую можно использовать в целях трансформации, то есть введения гетерологичной ДНК в клетку-хозяина. Одним типом вектора является «плазмида», которая относится к петле кольцевой двухцепочечной ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные участки ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, где дополнительные участки ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Кроме того, определенные векторы способны к направлению экспрессии генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в данном документе называют «экспрессионными векторами».

Термин «экспрессионный вектор», в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к репликации и экспрессии гена интереса при трансформации, трансфекции или преобразовании в клетку-хозяина. Экспрессионные векторы содержат один или более чем один фенотипический селективный маркер и точку начала репликации для обеспечения поддержания вектора и, при необходимости, для обеспечения амплификации в пределах хозяина. Экспрессионный вектор дополнительно содержит промотор для управления экспрессией полипептида в клетках. Подходящие экспрессионные векторы могут представлять собой плазмиды, полученные, например, из pBR322 или разные плазмиды pUC, которые

имеются в продаже. Другие экспрессионные векторы могут быть получены из следующих экспрессионных векторов: бактериофаг, фагмида или космида.

Дополнительные воплощения изобретения

В конкретных воплощениях изобретения предложены мышинные моноклональные антитела, идентифицированные в результате скрининга клонов мышинных гибридом, как описано в данном документе.

В других воплощениях согласно изобретению предложены композиции следующих полинуклеотидных последовательностей и последовательностей белков:

а) Последовательность кДНК, SEQ ID NO 3, кодирующая переменную область тяжелой цепи мышинового mAb 317;

б) Белковая последовательность переменной области тяжелой цепи мышинового mAb 317 или μ 317_Vh (SEQ ID NO 4);

в) Последовательность кДНК, SEQ ID NO 5, кодирующая переменную область легкой цепи мышинового mAb 317;

г) Белковая последовательность переменной области легкой цепи мышинового mAb 317 или μ 317_Vk (SEQ ID NO 6);

д) Последовательность кДНК, SEQ ID NO 7, кодирующая переменную область тяжелой цепи мышинового mAb 326;

е) Белковая последовательность переменной области тяжелой цепи мышинового mAb 326 или μ 326_Vh (SEQ ID NO 8);

ж) Последовательность кДНК, SEQ ID NO 9, кодирующая переменную область легкой цепи мышинового mAb 326;

з) Белковая последовательность переменной области легкой цепи мышинового mAb 326 или μ 326_Vk (SEQ ID NO 10).

В одном аспекте изобретения предложены композиции, содержащие последовательности определяющей комплементарности области (CDR), которые содействуют связыванию с антигенами-мишенями, PD-1, включая последовательности CDR μ 317 и m326:

а) CDR1 тяжелой цепи μ 317 (μ 317 H-CDR1) содержит аминокислотную последовательность GFSLTSYGVH (SEQ ID NO 11);

б) H-CDR2 μ 317 содержит аминокислотную последовательность VIWAGGSTNYNSALMS (SEQ ID NO 12);

в) H-CDR3 μ 317 содержит аминокислотную последовательность ARAYGNYWYIDV (SEQ ID NO 13);

г) CDR1 легкой цепи μ 317 (μ 317 L-CDR1) содержит аминокислотную последовательность KASQSVSNDVA (SEQ ID NO 14);

д) L-CDR2 μ 317 содержит аминокислотную последовательность YAFHRFT (SEQ ID NO 15);

е) L-CDR3 μ 317 содержит аминокислотную последовательность HQAYSSPYT (SEQ NO 16);

ж) H-CDR1 μ 326 содержит аминокислотную последовательность GYTFTNYGMN (SEQ ID NO 17);

з) H-CDR2 μ 326 содержит аминокислотную последовательность WINNNNGEPTYAEFEKKG (SEQ ID NO 18);

и) H-CDR3 μ 326 содержит аминокислотную последовательность ARDVMDY (SEQ ID NO 19);

к) L-CDR1 μ 326 содержит аминокислотную последовательность RASEVDNYGYSFMH (SEQ ID NO 20);

л) L-CDR2 μ 326 содержит аминокислотную последовательность RASNLES (SEQ ID NO 21);

м) L-CDR3 μ 326 содержит аминокислотную последовательность QQSKEYPT (SEQ ID NO 22).

В другом воплощении изобретения предложены композиции, содержащие последовательности гуманизированных моноклональных антител, выделенных из мышинных mAb μ 317 и μ 326, включая следующее:

а) гуманизированное mAb hu317-4B6 содержит белковую последовательность переменной области тяжелой цепи (Vh) в виде SEQ ID NO 24, которая кодируется

б) кДНК hu317-4B6_Vh (SEQ ID NO 23);

в) гуманизированное mAb hu317-4B6 также содержит белковую последовательность переменной области легкой цепи (Vk) в виде SEQ ID NO 26, которая кодируется

г) кДНК hu317-4B6 (SEQ ID NO 25);

д) гуманизированное mAb hu326-4A3 содержит белковую последовательность Vh в виде SEQ ID NO 28, которая кодируется

е) кДНК hu326-4A3-Vh (SEQ ID NO 27);

ж) гуманизированное mAb hu326-4A3 также содержит белковую последовательность Vk в виде SEQ ID NO 30, которая кодируется

з) кДНК hu326-4A3_Vk (SEQ ID NO 29);

и) белковые последовательности hu317-4B2_Vh (SEQ ID NO 43) и hu317-4B2_Vk (SEQ ID NO 44);

к) белковые последовательности hu317-4B5_Vh (SEQ ID NO 45) и hu317-4B5_Vk (SEQ ID NO 46);

л) белковая последовательность hu317-1_Vh (SEQ ID NO 48) и кДНК, кодирующая hu317-1_Vh (SEQ ID NO 47);

м) белковая последовательность hu317-1_Vk (SEQ ID NO 50) и кДНК, кодирующая hu317-1_Vk (SEQ ID NO 49);

н) белковые последовательности hu326-3B1_Vh (SEQ ID NO 51) и hu326-3B1_Vk (SEQ ID NO 52);

о) белковые последовательности hu326-3G1_Vh (SEQ ID NO 53) и hu326-3G1_Vk (SEQ ID NO 54);

п) белковая последовательность hu326-1_Vh (SEQ ID NO 56) и кДНК, кодирующая hu326-1_Vh (SEQ ID NO 55);

р) белковая последовательность hu326-1_Vk (SEQ ID NO 58) и кДНК, кодирующая hu326-1_Vk (SEQ ID NO 57);

с) белковые последовательности других гуманизированных mAb, происходящих из mu317 (SEQ ID NO 63-74);

т) белковые последовательности других гуманизированных mAb, происходящих из mu326 (SEQ ID NO 75-82);

В одном аспекте изобретения предложены композиции, содержащие последовательности CDR гуманизированных моноклональных антител. CDR могут быть общими в пределах одной и той же серии гуманизированных антител, таких как hu317 или hu326 (см. Таблицу 15-16). Неизбыточные CDR перечислены ниже:

а) H-CDR1 последовательность GFSLTSYGVH (SEQ ID NO 31), являющаяся общей для гуманизированных mAb hu317 и mu317 в тяжелых цепях;

б) H-CDR3 последовательность ARAYGNYWYIDV (SEQ ID NO 33), являющаяся общей для гуманизированных mAb hu317 и mu317 в тяжелых цепях;

в) L-CDR1 последовательность KSSSESVSNDVA (SEQ ID NO 34), являющаяся общей для гуманизированных mAb hu317-4B2, hu317-4B5 и hu317-4B6 в легких цепях;

г) L-CDR2 последовательность YAFHRFT (SEQ ID NO 35), являющаяся общей для гуманизированных mAb hu317 и mu317 в легких цепях;

д) L-CDR3 последовательность HQAYSSPYT (SEQ ID NO 36), являющаяся общей для гуманизированных mAb hu317 и mu317 в легких цепях;

- е) H-CDR2 последовательность VIYADGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO 32) в hu317-4B6_Vh;
- ж) H-CDR2 последовательность VIYAGGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO 60) в hu317-4B2_Vh и hu317-4B5_Vh;
- з) H-CDR2 последовательность VIWAGGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO 59) в hu317-1_Vh;
- и) L-CDR1 последовательность KASQSVSNDVA (SEQ ID NO 11) в hu317-1_Vk;
- к) H-CDR1 последовательность GYTFTNYGMN (SEQ ID NO 37), являющаяся общей для гуманизированных mAb hu326 и mu326 в тяжелых цепях;
- л) H-CDR3 последовательность ARDVMDY (SEQ ID NO 39), являющаяся общей для гуманизированных mAb hu326 и mu326 в тяжелых цепях;
- м) L-CDR1 последовательность RASESVDNYGYSFMH (SEQ ID NO 40), являющаяся общей для гуманизированных mAb hu326 и mu326 в легких цепях;
- н) L-CDR2 последовательность RASNLES (SEQ ID NO 41), являющаяся общей для гуманизированных mAb hu326 и mu326 в легких цепях;
- о) L-CDR3 последовательность QQSKEYPT (SEQ ID NO 42), являющаяся общей для гуманизированных mAb hu326 и mu326 в легких цепях;
- п) H-CDR2 последовательность WINNNNAEPTYAQDFRG (SEQ ID NO 38) в hu326_4A3_Vh;
- р) H-CDR2 последовательность WINNNNGEPTYAQGFRG (SEQ ID NO 62) в Vh hu326_1 и других mAb hu317.

В другом аспекте изобретения предложены конкретные эпитопы связывания гуманизированных mAb против PD-1 на антигене и их функциональное применение. Шесть крайне важных аминокислотных остатков (AA) в PD-1, требуемых для связывания лиганда, были по отдельности мутированы, и мутантные белки и белки дикого типа PD-1 использовали для оценки эпитопов связывания. Остаток, чья мутация значительно ухудшала связывание антитела, считается ключевым или значимым эпитопом связывания. Значимые эпитопы связывания mAb hu317-4B5 и hu317-4B6 представляют собой K45 и I93 (нумерация AA на основе 2008 PNAS, 105:10483; что соответствует K58 и I106 в SEQ ID NO 2); и значимые эпитопы связывания mAb hu326-3B1 и hu317-4A3 представляют собой I93, L95 и P97 (нумерация AA на основе 2008 PNAS, 105:10483; что соответствует I106, L108 и P110 в SEQ ID NO 2).

В другом аспекте изобретения предложены композиции, содержащие последовательности константных областей рекомбинантных вариантов IgG4 человека, которые могут быть связаны с переменными областями заявленных антител, включая

гуманизированные mAb против PD-1, которые демонстрировали предпочтительные эффекторные функции и физико-химические свойства. Последовательности выглядят следующим образом:

Последовательность константной области IgG4mt10 (SEQ ID NO 88);

а) Референсная последовательность IgG4mt1 (SEQ ID NO 83);

б) Референсная последовательность IgG4mt2 (SEQ ID NO 84);

в) Референсная последовательность IgG4mt6 (SEQ ID NO 85);

г) Референсная последовательность IgG4mt8 (SEQ ID NO 86);

д) Референсная последовательность IgG4mt9 (SEQ ID NO 87).

В другом воплощении изобретения предложены способы анализа функций антитела к PD-1 посредством плазмиды, экспрессирующей рекомбинантный слитый белок, OS8, с созданием стабильных линий клеток, HEK293/OS8/PD-L1 или HEK293/OS8/PD-L2, которая совместно экспрессирует OS8 (молекула, активирующая Т-клетки) и лиганд PD-1. Линии клеток использовали для активации Т-клеток и МКПК посредством совместной культивации для оценки функциональности mAb против PD-1 (см. Пример 3 и Пример 4). В качестве альтернативы, другую плазмиду, экспрессирующую рекомбинантный слитый белок, P3Z, использовали для создания стабильной линии клеток, NuT78/P3Z, в которой P3Z функционирует в качестве молекулярного сенсора и медиатора трансдукции сигнала. Когда P3Z активируется лигандом PD-1, он будет передавать внутриклеточный сигнал для активации высвобождения IL-2 в клетках NuT78. Эти системы можно использовать для оценки ингибирующего действия mAb против PD-1 (см. Пример 3).

В одном аспекте изобретения предложены композиции, содержащие следующие аминокислотные последовательности рекомбинантных слитых белков:

а) Белковая последовательность OS8 (SEQ ID NO 89);

б) Белковая последовательность P3Z (SEQ ID NO 90).

В другом аспекте изобретения предложены способы создания стабильных линий клеток, которые экспрессируют рекомбинантные слитые белки, описанные здесь, и способы применения системы для количественного анализа функциональных активностей mAb против PD-1.

В другом воплощении изобретения предложены полинуклеотиды, кодирующие заявленные белки. Полинуклеотиды могут быть функционально связаны с гетерологичной, регулирующей транскрипцию последовательностью для экспрессии и могут быть включены в векторы, клетки и т.д.

В другом воплощении изобретения предложены мышинные антитела к PD-1 и гуманизированные антитела к PD-1, включая hu317-4B6, hu317-4B5, hu317-4B2 и т.д., и hu326-4A3, hu326-3B1, hu326-3G1 и т.д., выполняющие функции подавления PD-1 опосредованной трансдукции сигнала и активации клеток иммунной системы, которые запускают каскад иммунных ответов, включая выделение цитокинов и цитотоксичность в отношении клеток-мишеней, таких как раковые клетки, и такое функциональное применение данных антител.

В одном аспекте изобретения предложены гуманизированные антитела к PD-1, которые активируют несколько типов клеток иммунной системы, которые экспрессируют PD-1, включая Т-клетки, NK-клетки и МКПК, чьи функции заключаются в усилении сигналов иммунного ответа, в мобилизации иммунной системы и в действии в качестве иммунных эффекторных клеток для устранения раковых клеток и вирусных инфекций, и такое функциональное применение данных антител.

В другом аспекте гуманизированные mAb к PD-1 используют в качестве терапевтических агентов для лечения заболеваний человека, которые участвуют в подавлении клеток иммунной системы посредством PD-1- опосредованной внутриклеточной сигнализации, приводя к развитию заболевания, в частности раковых заболеваний и вирусных инфекций.

Композиции по изобретению являются полезными в лечении рака, нейродегенеративных и инфекционных, в частности вирусных, заболеваний и других состояний, при которых ненадлежащая и пагубно влияющая экспрессия человеческого PD-1 является компонентом этиологии или патологии состояния. Следовательно, согласно изобретению предложены способы лечения рака или ингибирования развития опухоли у нуждающегося в этом субъекта заявленным белком против PD-1. Согласно изобретению дополнительно предложено применение заявленных полинуклеотидов для изготовления лекарственного средства для лечения рака или ингибирования развития опухоли у субъекта.

Изобретение включает все комбинации изложенных конкретных воплощений. Другие воплощения и полный объем применимости изобретения станут очевидными из подробного описания, приведенного ниже в данном документе. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, несмотря на то, что показывают предпочтительные воплощения изобретения, даны исключительно в качестве иллюстрации, так как разные изменения и модификации в пределах сущности и объема изобретения станут очевидными специалистам в данной области из данного подробного описания. Все публикации, патенты и патентные заявки, приведенные в данном

документе, включая ссылки в них, во всех отношениях включены в данный документ во всей полноте посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Создание моноклонального антитела к PD-1

Моноклональные антитела к PD-1 (mAb) создавали на основе традиционной гибридной технологии слияния (Kohler and Milstein 1976 Eur J Immunol 6:511-519; de St Groth and Sheidegger 1980, J Immunol Methods 35:1-21; Mechetner 2007 Methods Mol Biol 378:1-13) с незначительными модификациями. МAb с высокой активностью связывания в твердофазном иммуносорбентном анализе (ELISA) и анализе на основе сортировки клеток с возбуждением флуоресценции (FACS) отбирали для дальнейшей характеристики.

Рекомбинантный белок PD-1 для анализов иммунизации и связывания

Экспрессионную плазмиду, содержащую кДНК полноразмерного PD-1 человека, получали от Origene (кат. № SC117011, учетный № NCBI: NM_005018.1, Пекин, Китай). Внеклеточный домен, состоящий из аминокислоты (AA) 1-168 PD-1 (SEQ NO.1, SEQ NO.2), амплифицировали посредством ПЦР и субклонировали в экспрессионный вектор на основе pcDNA3.1 (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния, США) с С-концом, слитым либо с His₆ меткой, либо с γ Fc доменом тяжелой цепи человеческого IgG4, что приводило к получению двух экспрессионных плазмид с рекомбинантным слитым белком, PD-1-EC/His и PD-1-EC/Fc (сокращенно PD-1/His и PD-1/Fc). Схематичное представление белков иммуноген/антиген показано на Фиг.1. Для получения рекомбинантных слитых белков клетки 293-F временно трансфицировали плазмидами PD-1/His и PD-1/Fc в 1-3 литрах среды (Invitrogen) и культивировали в течение 5-7 суток в CO₂-инкубаторе, оснащенный ротационным шейкером. Супернатант, содержащий рекомбинантный белок, собирали и очищали посредством центрифугирования при 15000 g в течение 30 минут. PD-1/His очищали методом аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных металлов, используя Ni-Sepharose Fast Flow (кат. № 17531801, GE Lifesciences, Шанхай, Китай) с последующей эксклюзионной хроматографией с использованием колонки HiLoad 16/60 Superdex 200 (кат. № 17106901, GE Lifesciences, Шанхай, Китай). PD-1/Fc очищали, используя колонку Protein G Sepharose Fast Flow (кат. № 17061805, GE Lifesciences). Оба белка PD-1/His и PD-1/Fc диализировали против фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) и хранили в морозильной камере при -80°C в маленьких аликвотах.

кДНК, кодирующую человеческий PD-L1, химически синтезировали Genescript (Нанкин, Китай) на основе опубликованной последовательности (учетный № NCBI NM_014143). Экспрессионную плазмиду PD-L2 приобретали у Origene (кат. № SC108873, учетный № NCBI NM_025239.2, Пекин, Китай). Обе кДНК клонировали в pcDNA3.1/Гигромицин (кат. № V870-20, Invitrogen) и pcDNA3.1/V5-His (кат. № V810-20, Invitrogen), соответственно.

Стабильная линия экспрессирующих клеток

Стабильные линии клеток, экспрессирующие человеческий PD-1, PD-L1 или PD-L2, закладывали посредством трансфекции HUT78 (ATCC, Manassas, VA, США) и HEK293 (ATCC) плазмидами pcDNA3.1, содержащими PD-1, PD-L1 и PD-L2, соответственно, с последующей селекцией с использованием среды, содержащей 200 микрограмм гигромицина (кат. № 10687-010, Invitrogen) или 1 мг G418 (Sigma) на миллилитр. Единичные клоны выделяли традиционным способом, либо методом предельных разведений, либо отбором единичных колоний с поверхности культуры лунки. Скрининг всех клонов проводили посредством Вестерн-блоттинга и анализа FACS с использованием антител к PD-1, PD-L1 и PD-L2 (кат. № 12-9969, 17-5983, 12-5888, eBioscience, Сан-Диего, США), соответственно, и клоны с наивысшим уровнем экспрессии отбирали для анализа связывания FACS для скрининга моноклональных антител гибридомы или использовали в функциональных анализах.

Иммунизация, гибридомное слияние и клонирование

Мышей Balb/c возраста восемь-двенадцать недель (от BEIJING HFK BIOCSIENCE CO.,LTD, Пекин, Китай) подкожно иммунизировали 100 мкл адьюванта (кат. № KX0210041, KangBiQuan, Пекин, Китай), содержащего 5 микрограмм PD-1/Fc. Иммунизацию проводили двумя инъекциями приведенного выше иммуногена с интервалом в три недели. Спустя две недели после 2-ой иммунизации, сыворотки мышей оценивали в отношении связывания PD-1 посредством FACS (следующие разделы). Отбирали мышей с высокими титрами антител к PD-1 в сыворотках и внутрибрюшинно проводили повторную иммунизацию 50 микрограммами PD-1/Fc в отсутствии какого-либо адьюванта. Спустя трое суток после повторной иммунизации, выделяли спленоциты и сливали с линией клеток мышинной миеломы, клетки SP2/0 (ATCC), используя стандартные методики (Geffer, M.L. et al., 1977 Somat Cell Genet, 3:231-236).

Оценка активности PD-1-связывания антител посредством ELISA и FACS

Сначала проводили скрининг супернатантов гибридных клонов посредством твердофазного иммуносорбентного анализа (ELISA), как описано в “Flanagan, M.L. et al. 2007 *Methods in Molecular Biology* 378:33-52” с некоторыми модификациями. Кратко, осуществляли покрытие 50-200 нанограммами белка PD-1/His или PD-1/Fc в 50 микролитрах фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) в 96-луночной планшете (Shenzhen JinCanHua Industry Co., Ltd, Shenzhen, Китай) в расчете на лунку. Антитело против мышинового IgG, связанное с HRP (кат. № 7076S, Cell Signaling Technology, США и Шанхай, Китай) и хемилюминесцентный реагент (кат. № PA107-01, TIANGEN, Китай) использовали для поиска и обнаружения сигнала ELISA, который считывали посредством планшет-ридера (PHREAstAr FS, BMG LABTECH, Германия) при длине волны 450 нм. ELISA-позитивные клоны-продуценты антител далее проверяли посредством сортировки клеток с возбуждением флуоресценции (FACS), используя традиционный способ. Стабильные клеточные линии с экспрессией PD-1, HuT78/PD-1 (10^5 клеток/лунка), описанные выше, окрашивали супернатантами гибридом, продуцирующими антитела к PD-1, в 96-луночных планшетах с V-образным дном (кат. № 3897, Corning, США и Шанхай, Китай). Для блокирования человеческих Fc рецепторов клетки предварительно инкубировали с человеческим IgG (20 мкг/мл) (кат. № H11296, LifeHolder, США и Шанхай, Китай). Антитела к PD-1 обнаруживали посредством Dylight™ 649-меченного козьего антитела против мышинового IgG (кат. № 405312, Biolegend, Сан-Диего, США), и клеточную флуоресценцию отслеживали, используя проточный цитометр (Guava easyCyte 8HT, Merck-Millipore, США и Шанхай, Китай).

Кондиционированные среды гибридных клеток, которые демонстрировали позитивный сигнал как в анализе ELISA, так и анализе FACS, подвергали функциональным анализам для идентификации антител с хорошей функциональной активностью в анализах, проводимых на клетках иммунной системы человека (в данном документе). Далее антитела с положительной функциональной активностью субклонировали и характеризовали.

Субклонирование и адаптация к среде без сыворотки или с низким ее содержанием

Положительные гибридные клоны от первичного скрининга посредством ELISA, FACS и функциональных анализов субклонировали традиционным методом предельных разведений. Каждый из положительных клонов осаждали в 96-луночной планшете, культивировали в среде RPMI1640 (кат. № SH30809.01B, Nucleon, Шанхай, Китай) с 10% фетальной телячьей сывороткой (FBS, кат. № SH30084.03, Nucleon, Пекин, Китай) в CO₂-инкубаторе. Три субклона из каждого планшета с предельным разведением отбирали и

описывали посредством FACS и функциональных анализов. Субклоны, отобранные посредством функциональных анализов, определяли как моноклональное антитело. Лучшие субклоны адаптировали для роста в среде CDM4MAb (кат. № SH30801.02, Hyclone) с 1-3% FBS.

Экспрессия и очистка моноклональных антител

Либо клетки гибридомы, продуцирующие мышинные моноклональные антитела, либо 293-F клетки, трансфицированные плазмидами с рекомбинантными антителами (кат. № R79007, Invitrogen), культивировали в среде CDM4MAb (кат. № SH30801.02, Hyclone) или экспрессионной среде Freestyle293 (кат. № 12338018, Invitrogen), соответственно, в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 5-7 суток. Кондиционированную среду собирали посредством центрифугирования при 10000 g в течение 30 минут с удалением всех клеток и остатков разрушенных клеток и фильтровали через 0,22 мкм мембрану перед очисткой. Мышинные или рекомбинантные антитела наносили и связывали с колонкой Белка А (кат. № 17127901, GE Life Sciences), следуя руководству от производителя, промывали PBS, элюировали в буфере, содержащем 20 mM цитрат, 150 mM NaCl, pH 3,5. Элюированные вещества нейтрализовали 1M Tris (трис(гидроксиметил)аминометан) pH 8,0, и обычно они содержали антитела с уровнем чистоты выше 90%. Антитела, аффинно очищенные с помощью Белка А, либо диализировали против PBS, либо дополнительно очищали, используя колонку HiLoad 16/60 Superdex200 (кат. № 17531801, GE Life Sciences) для удаления агрегатов. Концентрации белка определяли путем измерения поглощения при 280 нм или методом Брэдфорда (кат. № 1856210, Thermo Scientific, Rockford, IL, США), используя бычий IgG определенной концентрации (кат. № 23212, Thermo Scientific) в качестве стандартов. Очищенные антитела хранили в аликвотах в морозильной камере при -80°C.

Пример 2. Сравнение активностей связывания у антител к PD-1

Посредством скрининга тысяч гибридомных клонов авторы изобретения идентифицировали некоторое количество самых лучших моноклональных антител (mAb), которые связываются с человеческим PD-1 с высокой специфичностью и силой. Как показано в анализе ELISA (Фиг. 2), у трех самых лучших антител добивались такой силы и специфичности связывания. Результаты FACS анализа демонстрировали, что отобранные моноклональные антитела связываются с нативными белками PD-1, экспрессирующимися на поверхности клетки. Мышинные mAb317 (mu317), mu326 и mu150 демонстрировали зависимую от концентрации активность связывания, и их EC₅₀

связывания (эффективная концентрация при 50% активности) была значительно ниже, чем EC_{50} контрольного $\mu 55$ (Фиг. 3).

Оценка аффинности связывания mAb с помощью Поверхностного Плазмонного Резонанса (SPR)

MAb с высокими активностями связывания в ELISA и FACS, а также с сильными функциональными активностями в анализах на клетках (в данном документе), исследовали в отношении их кинетических констант связывания в реакциях связывания в реальном времени. Мышиные mAb против PD-1 очищали от супернатантов гибридомы, используя колонку Protein A Flow (кат. № 17531801, GE Life Sciences) с последующей эксклюзионной хроматографией, используя колонку HiLoad 16/60 Superdex200 (кат. № 17106901, GE Life Sciences). Очищенные антитела к PD-1 концентрировали до 0,5-1 мг/мл в PBS и хранили в аликвотах в морозильной камере при $-80^{\circ}C$.

Для определения аффинностей связывания mAb против PD-1 измерения SPR проводили в буфере HBS-N (10 mM HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин этансульфоновая кислота) pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота), 0,005 об./об.% поверхностно-активное вещество P20, GE Healthcare), используя прибор BIAcore™ T-200 (GE Life Sciences). Биосенсорный чип CM5 против мышиного Fc (GE Healthcare) создавали, используя стандартный протокол связывания первичного амина. MAb против PD-1 при 0,3 мкг/мл захватывали на поверхности против мышиного Fc в течение 1 мин при 10 мкл/мин. PD-1/Fc в серийных разведениях от 3,3 нМ до 120 нМ инъецировали по связанной с антителом поверхности в течение 3 мин при 30 мкл/мин с последующей 10 мин фазой диссоциации. Константы скорости ассоциации (K_a или k_{on}) и константы скорости диссоциации (K_d или k_{off}) рассчитывали, используя однозначную модель связывания Ленгмюра (BIA Evaluation Software, GE Life Sciences). Равновесную константу диссоциации (K_D) рассчитывали в виде отношения k_{off}/k_{on} .

Как показано в Таблице 1, как $\mu 326$, так и $\mu 517$, близкий член семейства последовательностей, связанный с $\mu 317$, имеют субнаномолярную K_D , составляющую 0,324 нМ и 0,289 нМ, соответственно, которая значительно лучше, чем K_D $\mu 134$. Константа скорости K_{on} была схожей у трех mAb, перечисленных в Таблице 1, при этом константа скорости K_{off} значительно различалась, причем у $\mu 134$ наблюдали гораздо более высокую скорость диссоциации.

Таблица 1. Константа связывания определенных лучших антител

mAb	K_{on} (M^{-1}, s^{-1})	K_{off} (с)	K_D (M)
-----	-------------------------------	---------------	-----------

mu326	$2,4 \times 10^5$	$7,79 \times 10^{-5}$	$3,24 \times 10^{-10}$
mu517	$1,96 \times 10^5$	$5,66 \times 10^{-5}$	$2,89 \times 10^{-10}$
mu134	$1,1 \times 10^5$	$3,69 \times 10^{-4}$	$3,35 \times 10^{-9}$

Определение аффинности Fab (антигенсвязывающий фрагмент) против PD-1 посредством SPR

MAb против PD-1 превращали в Fab версию посредством ПЦР со слиянием переменных областей тяжелых и легких цепей с N-концом человеческого IgG2-CH1 и константной областью каппа-цепи, соответственно, и субклонировали в вектор pcDNA3.1 (Invitrogen). Оба экспрессионных вектора совместно экспрессировали в клетках 293-F, используя протокол временной трансфекции, подобно временной экспрессии полноразмерных антител. Кратко, каппа-цепь Fab амплифицировали с помощью ПЦР и субклонировали в экспрессионный вектор на основе pcDNA3.1 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). В отдельной плазмиде переменную область тяжелой цепи (VH) вместе с CH1 кодирующей последовательностью из человеческого IgG2 сливали с C-концом с-Мус-His8 метки посредством ПЦР с перекрывающимися праймерами и затем субклонировали в экспрессионный вектор. В тяжелую цепь IgG2 вводили мутации C232S и C233S (нумерация остатков по Kabat, Kabat et al. Sequence of proteins of immunologic interest, 5th ed. Bethesda, MD, NIH 1991) для предотвращения замены дисульфидной связи и стабилизации человеческого IgG2 в конформации IgG2-A (Lightle et al. 2010 Protein Sci 19(4): 753-762). Обе конструкции содержали сигнальный пептид, расположенный выше зрелых последовательностей Fab. Секретируемой экспрессии Fab достигали посредством совместной трансфекции 293-F клеток описанными выше 2 плазмидами, и супернатанты клеточных культур собирали через 6-7 суток после трансфекции. His8-меченные Fab очищали от супернатантов клеточной культуры, используя колонку Ni-sepharose Fast Flow (кат. № 17531801, GE Life Sciences) с последующей эксклюзионной хроматографией с использованием колонки HiLoad 16/60 Superdex200 (кат. № 17106901, GE Life Sciences). Очищенные Fab концентрировали до 0,5-5 мг/мл в PBS и хранили в аликвотах в морозильной камере при -80°C .

Для определений аффинности Fab против PD-1 использовали анализы SPR с прибором BiacoreTM T-200 (GE Life Sciences). Кратко, PD-1/His человека или PD-1/His яванского макака соединяли с активированными биосенсорными чипами CM5 (кат. № BR100530, GE Life Sciences) с достижением приблизительно 100-200 единиц ответа (RU) с последующим блокированием непрореагировавших групп 1 М этаноламином. Образцы Fab возрастающей концентрации от 0,12 нМ до 90 нМ инъецировали в SPR подвижном

буфере (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,4) при 30 мкл/минута, и ответы на PD-1/His человека или PD-1/His обезьяны в виде связывания рассчитывали путем вычитания RU из холостой проточной ячейки. Константы скорости ассоциации (k_{on}) и константы скорости диссоциации (k_{off}) рассчитывали, используя однозначную модель связывания Ленгмюра (BIA Evaluation Software, GE Life Sciences). Равновесную константу диссоциации (K_d) рассчитывали в виде отношения k_{off}/k_{on} .

SPR-определенные аффинности связывания Fab против PD-1 перечислены в Таблице 18. Каждый Fab против PD-1 связывался с PD-1 человека с высокой аффинностью ($K_d = 0,15-1$ нМ). Все Fab, за исключением 326-3G1, связывались с немного более низкой, но сопоставимой (в 5-кратных пределах в отношении K_d) аффинностью с PD-1 яванского макака.

Пример 3. Функциональная активность антител к PD-1 в человеческих Т-клетках

Создание стабильных линий клеток

Пакующую ретровирусную линию клеток PT67, линии человеческих Т-клеток HuT78 и HEK293 получали из American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Сублинию HuT78/PD-1 HuT78, которая экспрессирует PD-1, создавали посредством ретровирусной трансдукции с использованием вектора pFB-neo (Stratagene/Agilent Tech, Santa Clara, CA), содержащего ген PD-1, согласно протоколу, описанному ранее (Zhang et al. 2005 Blood 106: 1544-1551). Активатор Т-клеток, заякоренное в мембране химерное Ab (OS8), конструировали посредством слияния одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv) mAb ОКТ3 против человеческого CD3 (Kipriyanov et al. 1997, PDS 10:445-453) с С-концевым доменом (113-220) мышинового CD8 α (учетный № NCBI: NP_001074579.1), который включает шарнирный, трансмембранный и цитоплазматический домены. Тем самым, scFv против CD3 заякоривается на поверхности клетки как активатор Т-клеток. Человеческий PD-L1, PD-L2 и кДНК OS8 субклонировали в вектор pCDNA3.1. Стабильные линии клеток линии HEK293/OS8/PD-L1, Hep3B/OS8/PD-L1 и HEK293/OS8/PD-L2, которые совместно экспрессируют как кДНК OS8, так и PD-L1 или PD-L2, создавали посредством совместной трансфекции клеток HEK293 и Hep3B (ATCC) парными плазмидами с последующей селекцией с гигромицином или G418 в течение 10-14 суток. Линии клеток затем клонировали методом предельных разведений, как описано ранее (Fuller SA, et al. Curr Protoc Mol Biol. Chapter 11:Unit11.8., 2001). Химерный рецептор PD-1, называемый P3Z, конструировали посредством слияния внеклеточного и трансмембранного доменов человеческого PD-1 с цитоплазматическим доменом цепи CD3 ζ человека (учетный № NCBI NP_932170.1). P3Z-кодирующую последовательность

кДНК клонировали в рFB-нео и доставляли в клетки NuT78 посредством ретровирусной трансдукции с получением клеток NuT78/P3Z.

Определение функций антитела к PD-1 по высвобождению IL-2 в клетках NuT78/ PD-1

Для определения того, могут ли антитела к PD-1 блокировать взаимодействие PD-L1-индуцированной PD-1 сигнализации, клетки NuT78/PD-1 ($1,5 \times 10^4$ клеток на лунку в 96-луночном планшете) предварительно инкубировали с супернатантами гибридомы или антителами к PD-1 в течение 15 минут перед совместной культивацией с клетками HEK293/OS8/PD-L1 или HEK293/OS8/PD-L2 (4×10^4 на лунку) в плоскодонном планшете с добавлением 200 мкл питательной среды RPMI1640 на лунку при 37°C. Спустя 16-18 часов собирали супернатанты совместной культуры. IL-2 анализировали посредством ELISA, используя человеческие IL-2 наборы для ELISA Ready-Set-Go! (кат. № 88-7025, eBiosciences, San Diego, CA). В данном анализе блокада PD-1 сигнализации антителами к PD-1 приводила к усиленной TCR сигнализации и продукции IL-2 (Фиг. 4).

Как показано на Фиг. 5 и в Таблице 2, мышинное mAb против PD-1, mu317 и mu326, вызывало значительно более высокую функциональную активность, чем mu30, ингибируя PD-L1-индуцированную PD-1 сигнализацию, что приводит к повышенному уровню выделения IL-2. Оба имели более высокий уровень выделения IL-2 (верхняя кривая, Таблица 2), 675 и 634 пг/мл, соответственно, и оба имели более низкую EC₅₀ (эффективная концентрация mAb при уровне 50% индукции выделения IL-2), чем антитело mu30.

Таблица 2. Высвобождение IL-2, индуцированное mAb против PD-1 в клетках NuT78/PD-1, совместно культивируемых с клетками HEK293/OS8/PD-L1

Антитело	Нижняя кривая (пг/мл)	Верхняя кривая (пг/мл)	EC ₅₀ (мкг/мл)
mu30	95	527	0,229
mu317	95	675	0,083
mu326	95	634	0,053
mIgG	95	Н.Д. (нет данных)	Н.Д.
<p>Нижняя кривая: Среднее высвобождение IL-2, индуцированное mIgG при всех тестируемых концентрациях, см. Фиг. 5.</p> <p>Верхняя кривая: Самый высокий уровень высвобождения IL-2 на основе вычисления регрессионным анализом посредством программного обеспечения Prism, Фиг. 5.</p>			

Н.Д.: нет данных

Взаимодействие клеток HuT78/PD-1 с mAb против PD-1 не только блокировало PD-L1-индуцированную активацию Т-клеток, но также блокировало PD-L2-индуцированное высвобождение ИЛ-2. В Таблице 3 представлены данные, показывающие, что mi317 и mi326 проявляли гораздо более высокую эффективность в активировании Т-клеток, как показано с помощью параметров (EC_{50}) выделения ИЛ-2, чем эффективность в активировании Т-клеток mi476.

Таблица 3. Высвобождение ИЛ-2, индуцированное mAb против PD-1 в клетках HuT78/PD-1, совместно культивируемых с клетками HEK293/OS8/PD-L2

Антитело	Нижняя кривая (пг/мл)	Верхняя кривая (пг/мл)	EC_{50} (мкг/мл)
476	180	599	0,183
317	192	563	0,032
326	218	635	0,038
Нижняя кривая: Среднее высвобождение ИЛ-2, индуцированное в более низкой хвостовой части сигмоидной кривой реакции.			
Верхняя кривая: Среднее высвобождение ИЛ-2, индуцированное на пологом участке сигмоидной кривой реакции.			

Определение функций антител к PD-1 по обратной сигнализации высвобождения ИЛ-2 в клетках HuT78/P3Z

В химерном рецепторе P3Z домен PD-1 сигнализации заменяли цитоплазматическим доменом CD3 ζ . Таким образом, P3Z содействует активации при взаимодействии с PD-L1, а не ингибированию, как в случае исходного рецептора PD-1. В данном анализе клетки HuT78/P3Z (3×10^4 /лунка) предварительно инкубировали с супернатантами гибридомы или антителами к PD-1 в течение 15 минут перед совместным культивированием с клетками HEK293/PD-L1 или HEK293/PD-L2 (5×10^4 /лунка) в 96-луночных плоскодонных планшетах (общий объем 200 мкл/лунка) при 37°C. Спустя 16-18 часов, супернатанты собирали, и выработку ИЛ-2 анализировали ELISA, как описано выше.

Функциональную активность мышиных mAb против PD-1 дополнительно подтверждали посредством прямого считывания активации Т-клеток в анализе обратной

сигнализации, описанном выше. Согласно результату, описанному выше, m317 и m326 обладали наилучшей функциональной активностью среди mAb, скрининг которых проводили авторы изобретения. Как показано в Таблице 4 и Таблице 5, m317 и m326 были гораздо более эффективны, чем одно из mAb с низкой активностью, m37, как с точки зрения IC₅₀, так и максимального ингибирования.

Таблица 4. Ингибирование выделения IL-2 mAb против PD-1 в клетках HuT78/P3Z, совместно культивируемых с клетками HEK293/PD-L1

Антитело	IC ₅₀ (мкг/мл)	Макс. ингибирование, %
37	0,287	86,9
317	0,083	99,3
326	0,039	97,6
Максимальное ингибирование рассчитывали в виде процента (%) ингибирования mAb против PD-1, которые добавляли в культуру до самого высокого уровня 10 мкг/мл.		

Таблица 5. Ингибирование выделения IL-2 mAb против PD-1 в клетках HuT78/P3Z, совместно культивируемых с клетками HEK293/PD-L2

Антитело	IC ₅₀ (мкг/мл)	Макс. ингибирование, %
37	0,127	43,3
317	0,020	94,3
326	0,018	93,4
Максимальное ингибирование рассчитывали в виде процента (%) ингибирования mAb против PD-1, который добавляли в культуру до самого высокого уровня 10 мкг/мл.		

Пример 4. Активация выделения IFN- γ mAb против PD-1 в первичных человеческих МКПК, совместно культивируемых с клетками HEK293/OS8/PD-L1

Для проверки того, оказывают ли отобранные лучшие mAb против PD-1 действие также на первичные клетки иммунной системы человека, авторы изобретения анализировали функцию антител посредством использования свежевыделенных мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), которые главным образом состояли из Т-клеток (50-70%), В-клеток и NK-клеток (15-30%) и моноцитов (2-10%). МКПК человека выделяли из здоровых доноров посредством центрифугирования в градиенте плотности, используя фиколл – среду для фракционирования лимфоцитов

(Histopaque-1077; Sigma-Aldrich, MO) согласно инструкциям производителя. При всем сборе крови человека придерживались внутренней процедуры Beigene. Затем МКПК стимулировали mAb ОКТЗ против CD3 (40 нг/мл) (кат. № 16-0037, eBioscience, CA) в течение 3 суток перед анализом. Анализ FACS (Пример 1) показал, что уровень экспрессии PD-1 на активированных МКПК (главным образом Т клетки) повышался до изменяющейся, в зависимости от отдельно взятых доноров, степени. (Таблица 6). Для определения ответа предварительно активированных Т клеток на PD-1-лиганд-положительные опухолевые клетки при участии комплекса TCR/CD3, МКПК (1×10^4) совместно культивировали либо с клетками НЕК293/OS8/PD-L1, либо с клетками НЕК293/OS8/PD-L2 (3×10^4) в 96-луночных плоскодонных планшетах в течение 15-18 часов. Супернатанты, не содержащие клеток, анализировали в отношении уровня IFN- γ посредством ELISA, используя наборы для ELISA Ready-Set-Go! (кат. № 88-7316, eBiosciences), который является наиболее значимым показателем активации Т-клеток, а также активации других клеток иммунной системы (Thakur A. et al. 2012 Vaccine, 30:4907-4920).

МКПК и обработка	Процентное соотношение PD-1 положительно окрашенных клеток в сравнении с общим показателем исследованных МКПК	
	Донор-3	Донор-4
МКПК, не стимулированные / окрашенные Ab против PD-1	12,0%	3,2%
МКПК, стимулированные / окрашенные Ab против PD-1	40,0%	38,1%
МКПК, не стимулированные / окрашенные контрольным Ab	$\leq 0,5\%$	$\leq 0,5\%$
МКПК, стимулированные / окрашенные контрольным Ab	$\leq 0,5\%$	$\leq 0,5\%$
<p>Стимуляция: свежесыведенные МКПК культивировали в течение 3 суток в присутствии антитела против CD3, ОКТЗ, и IL-2.</p> <p>Без стимуляции: свежие МКПК, подверженные окрашиванию антителами и анализу FACS.</p>		

На Фиг. 6 показано, что присутствие mAb μ 317 и μ 326 в совместной культуре предварительно активированных МКПК и клеток HEK293/OS8/PD-L1 приводило к повышению аккумуляции IFN- γ дозозависимым образом. Несмотря на то, что исходный уровень IFN- γ с контрольной обработкой мышинным IgG различный у разных доноров, увеличение выделения IFN- γ в МКПК, обработанных μ 317 или μ 326, является статистически значимым в интервале от 0,1 до 10 мкг/мл обработки антителами. По сравнению с соответствующим уровнем mIgG-обработанных МКПК, выделение IFN- γ , индуцированное μ 317 и μ 326 в интервале уровней концентраций от 0,1 до 10 мкг/мл, увеличивалось в 2,5 - 3,2 раза в МКПК от Донора-19 и увеличивалось в 1,4 - 2,3 раза в МКПК Донора-20, соответственно.

Пример 5. Активация NK-клеток человека mAb против PD1

Стабильные линии клеток для функционального анализа в NK-клетках

Первичные NK-клетки человека, как сообщалось ранее, экспрессировали белок PD-1 в ответ на обработку IL-2, и ингибирование PD-1-опосредованной сигнализации усиливало цитотоксичность NK-клеток (2010 Blood, 116: 2286). Для количественного анализа функционального действия, оказываемого mAb против PD-1 в NK-клетках, линию NK-клеток человека NK92MI (ATCC) и линию раковых клеток легкого SK-Mes-1 (ATCC) создавали для стабильной экспрессии человеческих PD-1 и PD-L1, соответственно, посредством ретровирусной трансдукции в соответствии с протоколами, описанными ранее (Zhang et al. 2005, Blood 106: 1544-1551, Zhang et al. 2006, Cancer Res, 66: 5927). Две данные стабильные линии клеток были названы NK92MI/PD-1 и SK-Mes-1/PD-L1.

Ab против PD-1 стимулируют образование и выделение IFN- γ в клетках NK92MI/PD-1

Функциональную активность mAb против PD-1 на NK-клетках анализировали посредством количественного измерения образования и выделения IFN- γ в клетках NK92MI/PD-1, которые совместно культивировали с линией раковых клеток легкого SK-MES-1/PD-L1 в соотношении 1 к 2 в 96-луночном плоскостном планшете с общим количеством 6×10^4 клеток на лунку. mAb против PD-1 добавляли к клеткам NK92MI/PD-1 за 15 минут до начала совместной культивации, затем клетки совместно культивировали всю ночь в CO₂-инкубаторе. Супернатанты, не содержащие клеток, анализировали в отношении уровня IFN- γ посредством ELISA, как описано в Примере 4.

Все mAb против PD-1 вызывали значительное увеличение образования IFN- γ от исходного уровня с низкой концентрацией обработки антителами до самого высокого уровня с высокой концентрацией обработки антителами. Два лучших антитела, μ 317 и

mu326, имели более низкую EC_{50} , чем антитело сравнения 5C, указывая на то, что они оказывают более сильное активирующее действие на NK-клетки (Таблица 7).

Таблица 7. IFN- γ , выделяемый в среду (пг/мл) клетками NK92MI/PD-1 в присутствии mAb против PD-1 и клеток SK-MES-1/PD-L1

Антитело	Исходный уровень (пг/мл)	Самый высокий уровень (пг/мл)	EC_{50} (мкг/мл)
317	28	532	0,40
326	15	509	0,20
5C	20	535	1,17
Исходный уровень: Среднее высвобождение IFN- γ , индуцированное в нижней хвостовой части сигмоидной кривой реакции.			
Самый высокий уровень: Среднее высвобождение IFN- γ , индуцированное на пологом участке сигмоидной кривой реакции			

Антитело к PD-1 усиливает уничтожение раковых клеток, опосредованное клетками NK92MI/PD-1

Цитотоксичность клеток NK92MI/PD-1 в отношении клеток SK-MES-1/PD-L1 определяли с помощью анализа высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH) с использованием набора CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, WI). Кратко, клетки NK92MI/PD-1 (10^5) предварительно инкубировали с mAb против PD-1 при конечных концентрациях в пределах интервала 0,004-10 мкг/мл в течение 15 минут, и клетки SK-MES-1/PD-L1 (2×10^4) добавляли в культуру клеток иммунной системы в 96-луночном планшете с V-образным дном при отношении эффектора к опухолевой клетке (E:T) 5:1, затем совместно культивировали в течение 5 часов. Полный лизис опухолевых клеток определяли как максимальное уничтожение клеток, показание для каждого образца в анализе высвобождения LDH рассчитывали в виде процента от максимального уничтожения клеток. Уничтожение клеток (%) всех образцов нормировали по планшетам, используя 10% исходного уровня в качестве общего стандарта.

В анализе специфичной цитотоксичности, как установлено выше, отобранные mAb против PD-1 приводили к чистому уничтожению опухолевых клеток (= самый высокий уровень – исходный уровень), находящемуся в интервале 19% - 20,2% при высокой концентрации вводимых mAb. Mu317 и mu326 имели более низкую EC_{50} , чем mu336,

указывая на более высокую эффективность запуска уничтожения опухолевых клеток, опосредованного клетками NK92MI/PD-1 (Таблица 8).

Таблица 8. Цитотоксичность клеток NK92MI/PD-1 в отношении опухолевых клеток, индуцированная mAb против PD-1

Антитело	Исходный уровень (%)	Самый высокий уровень (%)	EC ₅₀ (мкг/мл)
317	10	29,06	0,50
326	10	30,19	0,37
336	10	29,72	1,52

Исходный уровень: Процент опухолевых клеток, уничтоженных не вследствие воздействия mAb против PD-1, приведенный к 10% по планшетах.

Самый высокий уровень: Средний процент опухоли, уничтоженной в присутствии самых высоких концентраций mAb, то есть 3 мкг/мл и 10 мкг/мл

Пример 6. Клонирование и анализы последовательностей mAb против PD-1

Клоны мышиной гибридомы, выделяющие специфичное mAb, культивировали до получения плотности $3 - 10 \times 10^6$ клеток в 100 мм чашке для культуры ткани, и клетки собирали посредством центрифугирования при 1500 об/мин на качающемся баке-ротаторе. Тотальную клеточную РНК выделяли, используя набор Ultrapure RNA (кат. № CW0581, CWBIOTECH, Пекин, Китай), следуя протоколу производителя. РНК ресуспендировали в дважды деионизированной воде, концентрацию измеряли с помощью NanoDrop (ThermoFisher, Шанхай, Китай).

ПЦР-праймеры, используемые для клонирования кДНК mAb, синтезировали в Invitrogen (Пекин, Китай) на основе последовательностей, приведенных ранее (Brocks et al. 2001 Mol Med 7:461-469). 1^{ую} нить кДНК синтезировали, используя обратную транскриптазу (кат. № АН301-02, Transgen Biotech, Пекин, Китай). ПЦР-амплификацию кДНК специфичных mAb проводили, используя набор реагентов для ПЦР (кат. № Ap221-12, TransGen Biotech, Пекин, Китай) и следуя протоколу производителя. ПЦР-продукт или непосредственно секвенировали с помощью сервисной службы (GeneWiz, Пекин, Китай), или субклонировали в вектор pCR (Invitrogen) с последующим секвенированием (GeneWiz).

Белковые последовательности мышиных mAb анализировали посредством выравнивания гомологии последовательностей. MAb группировали на основе гомологии последовательностей и результатов картирования эпитопов (Пример 13). Определяющие

комплементарность области (CDR) идентифицировали по Kabat (Wu, T.T. and Kabat, E.A., 1970 J. Exp. Med. 132: 211-250) и системе IMGT (ImMunoGeneTics) (Lefranc M.-P. et al., 1999 Nucleic Acids Research, 27, 209-212) посредством аннотации последовательностей и посредством анализа последовательностей на основе Интернет-данных (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/index.html и <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>). Как показано в Таблице 9, CDR mu317 и mu326 очень отличаются по длине и идентичности последовательностей.

Таблица 9. CDR mu317 и mu326

MAb	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
mu317, HC	<u>GFSLTSYGVH</u>	11	<u>VIWAGGSTNYNSALMS</u>	12	<u>ARAYGNYWYIDV</u>	13
mu317, LC	<u>KASQSVSNDVA</u>	14	<u>YAFHRFT</u>	15	<u>HQAYSSPYT</u>	16
mu326, HC	<u>GYTFTNYGMN</u>	17	<u>WINNNGEPTYAEFEKFG</u>	18	<u>ARDVMDY</u>	19
mu326, LC	<u>RASEVDNYGYSEFMH</u>	20	<u>RASNLES</u>	21	<u>QOSKEYPT</u>	22

Примечание: CDR, выделенные жирным шрифтом, соответствуют системе Kabat; Подчеркнутые CDR соответствуют системе IMGT.

Пример 7. Гуманизация мышиных mAb

Моделирование 3D структуры антител

Трехмерные структуры моделировали для переменных доменов mu317 и mu326 для идентификации каркасных остатков, которые могли бы быть важными для поддержания петлевых структур CDR. Потенциально важные каркасные остатки оставляли в виде исходных мышиных остатков в первом цикле гуманизации антител. Ранее разработанный способ структурного моделирования для антител (Morea et al. Methods 2000 20:267-279) переняли для моделирования 3D структуры mAb против PD-1 на основе известных канонических структур антител (Al-Lazikani et al. 1997 Journal of Molecular Biology 273:927-948). Кратко, последовательности каждого переменного домена (V_k и V_h) мышиного антитела исследовали в BLAST (Базовый инструментальный поиска локальных белков) в базе данных PDB (Protein Data Bank, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) для идентификации наиболее гомологичной последовательности антитела с известной структурой в высоком разрешении (разрешение меньше чем 2,5 ангстрем). Отобранные структурные матрицы для моделирования mu317 и mu326 (перечислены в Таблице 10) имели одни и те же классы канонических петлевых структур

в L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1 и H-CDR2 с целевыми антителами, предназначенными для моделирования. Если матрицы для Vk и Vh происходили от разных иммуноглобулинов, их упаковывали посредством подбора методом наименьших квадратов атомов основной цепи с образованием гибридной структуры остатков области взаимодействия Vk-Vh, которую использовали в качестве матриц для моделирования структурной гомологии с помощью швейцарской модельной программы (Kiefer et al. 2009 Nucleic Acids Research 37, D387-D392). Подбирали определенную конформацию боковых цепей, в то время как конформации основной цепи сохраняли. В сайтах, где исходная структура и смоделированная структура имели один и тот же остаток, конформацию боковых цепей сохраняли. В сайтах, где остатки различались, конформации боковых цепей моделировали на основе матричной структуры, библиотек ротамеров и особенностей упаковки. После гомологичного моделирования использовали программу PLOP (Jacobson et al. 2002 Journal of Physical Chemistry 106:11673-11680) для уточнения гомологичных моделей для минимизации энергии всех атомов и оптимизации области взаимодействия Vk и Vh. Данную стадию осуществляли для улучшения стереохимии, особенно в тех областях, где участки структур, происходящие от разных антител, соединялись вместе.

Таблица 10. Структурные матрицы, используемые в моделировании структур антител

Цепь антитела	PDB код матричной структуры (PDB матрица для H-CDR3)	Идентичность последовательностей	Сходство последовательностей
mu317 Vk	3MXV	87%	92%
mu317 Vh	3VFG	83%	91%
mu326 Vk	1EJO	92%	94%
mu326 Vh	1NCA	88%	90%
317-1 Vk	4HJJ	90%	95%
317-1 Vh	3VFG (1AY1)	75%	87%
326-1 Vk	1EJO	87%	92%
326-1 Vh	3T2N (3CXD)	84%	86%

Структуры также моделировали для CDR-привитых 317-1 и 326-1 для проведения дальнейших циклов конструирования антител с увеличением степеней гуманизации и/или

усилением стабильностей антител. Отобранные матрицы структур также перечислены в Таблице 10. Модели структур создавали похожим на приведенный выше способ образом, за исключением того, что возможные конформации H-CDR3 брали из матриц PDB 1AY1 для 317-1 и 3CXD для 326-1, соответственно, которые содержали H-CDR3 похожего размера и корпусной области. Минимизацию энергии для привитых H-CDR3 остатков осуществляли, используя PLOP.

Гуманизация

Для гуманизации mAb против PD-1 авторы изобретения осуществляли поиск человеческих генов IgG зародышевой линии, гомологичных последовательностям кДНК переменных областей μ 317 и μ 326 посредством проведения исследования в BLAST базы данных генов иммуноглобулина человека на веб-сайтах IMGT (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/index.html) и NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>). В качестве матрицы для гуманизации отбирали человеческие IGVH и IGV κ с высоким уровнем гомологии с mAb против PD-1.

Гуманизацию по существу проводили посредством CDR-прививания. В 1^{ом} цикле гуманизации мутации мышиных до человеческих аминокислотных остатков в каркасных последовательностях переменных областей направляли посредством смоделированных 3D структур, и только мышиные аминокислотные остатки, при замене которых сохраняется общая структура антител и структура CDR петель, подвергали мутации до человеческой последовательности, как описано выше. Исходные версии гуманизированных mAb представляли собой hu317-1 (SEQ NO 47-50) и hu326-1 (SEQ NO 55-58), которые содержат тяжелую цепь с гуманизированной переменной областью тяжелой цепи (V μ), слитой с константной областью человеческого IgG2 (учетный № NCBI P01859), и легкую цепь с гуманизированной переменной областью легкой каппа-цепи (V κ), слитой с С-областью каппа человеческого Ig (учетный № NCBI P01834). Подобным образом, авторы изобретения создавали химерные антитела из μ 317 и μ 326, которые состоят из мышиной VH, слитой с константной областью человеческого IgG2, и мышиной V κ , слитой с С-областью каппа человеческого Ig. Полноразмерные химерные антитела были названы ch317 и ch326, соответственно. Все рекомбинантные mAb экспрессировали и очищали, как описано в Примере 1.

FACS и функциональные анализы показали, что mAb hu317-1 почти что сохраняло такую же активность связывания и функциональную активность, как μ 317 и ch317. Различие в EC₅₀ в анализе FACS между μ 317 и ch317 и hu317-1 можно объяснить тем фактом, что в FACS использовали два разных детекторных антитела, козье против

мышинного IgG и козье против человеческого IgG. В двух данных функциональных анализах все три версии 317 подвергали более равной обработке, и результаты также похожи между собой (Таблица 11).

В результате первоначального цикла гуманизации μ 326 mAb hu326-1 сохраняло функциональный признак, схожий с исходными ch326 и μ 326, хотя функциональная активность в FACS анализе связывания и в анализе высвобождения IL-2 с участием клеток HuT78/PD-1 возможно немного слабее, чем в случае ch326 (Таблица 12).

Таблица 11. Сравнение μ 317, ch317 и hu317-1 посредством FACS анализа и функциональных анализов

Анализ/Параметр		μ 317	ch317	hu317-1
FACS	EC ₅₀ (мкг/мл)	0,11	0,36	0,46
	Наивысшая MFI*	205	217	203
Анализ-1	EC ₅₀ (мкг/мл)	0,11	0,08	0,09
	Самый высокий уровень (пг/мл)	346	294	386
	Исходный уровень (пг/мл)	98	82	91
Анализ-2	IC ₅₀ (мкг/мл)	0,11	0,10	0,11
	Макс. ингибирование	99,5%	99,0%	99,8%
*MFI: средняя интенсивность флуоресценции из FACS анализа Анализ-1: Высвобождение IL-2, индуцированное mAb в клетках HuT78/PD-1, совместно культивируемых с клетками HEK293/OS8/PD-L1 Анализ -2: Высвобождение IL-2, индуцированное mAb в клетках HuT78/P3Z, совместно культивируемых с клетками HEK293/PD-L1				

Таблица 12. Сравнение μ 326, ch326 и hu326-1 посредством FACS анализа и функциональных анализов

Анализ/ Параметр		μ 326	ch326	hu326-1
FACS	EC ₅₀ (мкг/мл)	0,126	0,072	0,117

	Наивысшая MFI	195	163	129
Анализ-1	EC ₅₀ (мкг/мл)	0,038	0,074	0,112
	Самое высокий уровень (пг/мл)	1149	1057	1143
	Исходный уровень (пг/мл)	242	250	283
Анализ-2	IC ₅₀ (мкг/мл)	0,14	0,12	0,10
	Макс. ингибирование	96,9%	81,0%	84,4%
Анализ-1: Высвобождение IL-2, индуцированное mAb в клетках HuT78/PD-1, совместно культивируемых с клетками HEK293/OS8/PD-L1				
Анализ -2: Высвобождение IL-2, индуцированное mAb в клетках HuT78/P3Z совместно культивируемых с клетками HEK293/PD-L1				

На основе 1^{ого} цикла гуманизации авторы изобретения дополнительно подвергали мутации другие мышинные аминокислотные остатки (AA) в каркасной области (FR) hu317-1_Vh и _Vk по отдельности для оценки влияния на функцию антител. Как показано в Таблице 13, все семь отдельных мутаций в Vh и одна мутация в Vk hu317-1 обладают похожими функциональными активностями. Наблюдали лишь незначительные изменения при некоторых мутациях Vh, например, hu317-2_K71V, со слегка более слабой ингибирующей функцией среди мутаций. Однако когда все мышинные аминокислотные остатки совместно подвергали мутации до человеческих (hu317-3A), функция становилась явно слабее, чем в случае остальных мутаций в FACS анализе и анализе высвобождения IL-2.

В первоначальном испытании, описанном выше, hu326-1 достигало значительного уровня гуманизации в FR, за исключением нескольких оставшихся мышинных AA остатков. Кроме того, оно имеет более слабую функцию, чем mu326. Вследствие этого, авторы изобретения создали больше отдельных мутаций, либо обратно в мышинные остатки, либо далее в человеческие остатки, для исследования вклада каждого отдельного AA остатка в функцию mAb326. В Таблице 14 представлены все единичные мутации AA, сделанные на основе матрицы hu326-1_Vh (SEQ NO 56, SEQ NO 57), и полученные по ним результаты функционального анализа. Большинство мутаций показало более высокую функциональную активность, чем в случае hu326-1, что соответствует исходному mAb mu326. Пара мутаций (E46K и F95Y) демонстрировали немного меньшую

эффективность по EC_{50} или IC_{50} , указывая на роль тех остатков в структуре и функции антитела.

Таблица 13. Сравнение функциональной активности Fab с мутациями гуманизации в каркасной области hu317-1

Fab и состав		FACS, EC_{50}	Высвобождение IL-2 в HuT78/P3Z	
Vh	Vk		Макс. ингибирование, %	EC_{50}
hu317-1_Vh	hu317-1_Vk	0,19	98,78	0,30
hu317-2_L48I	hu317-1_Vk	0,14	98,51	0,37
hu317-2_L67V	hu317-1_Vk	0,15	98,57	0,30
hu317-2_K71V	hu317-1_Vk	0,18	96,55	0,48
hu317-2_N73T	hu317-1_Vk	0,15	98,29	0,31
hu317-2_S76N	hu317-1_Vk	0,13	98,56	0,28
hu317-2_V78F	hu317-1_Vk	0,18	98,03	0,38
hu317-2_M82L	hu317-1_Vk	0,13	98,47	0,27
hu317-1_Vh	HU317- 2_G100Q	0,21	98,86	0,27
hu317-3A	hu317-1_Vk	0,32	79,66	0,35

Примечание: Единицей для выражения EC_{50} является мкг/мл; нумерация мутированных аминокислотных остатков является такой же, как в перечисленных последовательностях для hu317-1; hu317-3A имеет всю последовательность каркасной области, подвергнутую мутации до человеческой.

Таблица 14. Сравнение функциональной активности mAb с мутациями в каркасной области hu326-1

Антитело	FACS, EC_{50} мкг/мл	Высвобождение IL-2 в HuT78/P3Z		Высвобождение IL-2 в HuT78/PD-1	
		Макс. ингибирование, %	IC_{50} , мкг/мл	Самый высокий уровень,	EC_{50} , мкг/мл

				пг/мл	
ch326	0,118	93,05	0,074	993	0,135
hu326-1	0,317	92,38	0,087	987	0,213
hu326-2 S9P ^B	0,145	96,04	0,075	1022	0,136
hu326-2 A16E ^B	0,155	96,33	0,078	1048	0,126
hu326-2 E46K ^B	0,132	95,25	0,079	1244	0,259
hu326-2 G63D ^B	0,139	96,44	0,064	1069	0,120
hu326-2 A76V ^F	0,102	96,65	0,071	1002	0,112
hu326-2 S84N ^B	0,131	96,52	0,060	1015	0,126
hu326-2 S85N ^B	0,110	95,62	0,093	932	0,104
hu326-2 T88N ^B	0,098	95,85	0,102		
hu326-2 F95Y ^F	0,097	95,62	0,166	1028	0,135

^B: Обратная мутация до мышьиной аминокислоты; ^F: Прямая мутация до человеческой аминокислоты.

Все мутации получали в hu326-1_Vh (SEQ NO 56), которые составляли пару hu326-1_Vk (SEQ NO 58).

Для исследования наилучшего возможного состава последовательностей Vh и Vk для mAb 317 и 326, который можно было бы использовать в качестве терапевтических средств у человека, авторы изобретения создали множество комбинаций мутаций (включая некоторые мутации в CDR последовательностях), принимая во внимание характеристики антител, такие как уровень гуманизации в FR, функциональные активности, физико-химические свойства, антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) и комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC). Большинство мутаций считались неудовлетворяющими квалификационным требованиям. С помощью процесса конструирования были отобраны шесть гуманизованных, рекомбинантных mAb по причине их потенциальной терапевтической ценности: hu317-4B2 (SEQ ID NO 43-44), hu317-4B5 (SEQ ID NO 45-46), hu317-4B6 (SEQ ID NO 23-26), hu326-3B1 (SEQ ID NO 51-52), hu326-3G1 (SEQ ID NO 53-54) и hu326-4A3 (SEQ ID NO 27-30). CDR mAb сравнивали с CDR исходных мышьиных антител, показанными в Таблице 15 и Таблице 16.

Среди шести mAb, hu317-4B2, hu317-4B5 и hu317-4B6 тесно связаны друг с другом по последовательностям и очень похожи по своим функциональным активностям и силе. С другой стороны, hu326-3B1, hu326-3G1 и hu326-4A3 довольно близки друг к другу по последовательностям и функциональным характеристикам (Таблица 17-18). В пределах

каждой из данных двух групп mAb они также обладали многими другими общими признаками помимо последовательностей и функции, такими как физико-химические свойства и эпитопы связывания (описанные в Примере 10 и 11), хотя некоторые незначительные различия действительно существуют.

Таблица 15. Сравнение CDR у разных версий mAb 317

mAb	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
mu317, HC	GFSLTSYGVH	11	VIWAGGSTNYNSALMS	12	ARAYGNYWYIDV	13
hu317-1, HC	GFSLTSYGVH	11	VIWAGGSTNYN <u>PSLKS</u>	59	ARAYGNYWYIDV	13
hu317-4B2, HC	GFSLTSYGVH	11	VI <u>Y</u> AGGSTNYN <u>PSLKS</u>	60	ARAYGNYWYIDV	13
hu317-4B5, HC	GFSLTSYGVH	11	VI <u>Y</u> AGGSTNYN <u>PSLKS</u>	60	ARAYGNYWYIDV	13
hu317-4B6, HC	GFSLTSYGVH	11	VI <u>Y</u> <u>A</u> DGSTNYN <u>PSLKS</u>	32	ARAYGNYWYIDV	13
mu317, LC	KASQSVSNDVA	14	YAFHRFT	15	HQAYSSPYT	16
hu317-1, LC	KASQSVSNDVA	14	YAFHRFT	15	HQAYSSPYT	16
hu317-4B2, LC	K <u>S</u> <u>S</u> E <u>S</u> SVSNDVA	61	YAFHRFT	15	HQAYSSPYT	16
hu317-4B5, LC	K <u>S</u> <u>S</u> E <u>S</u> SVSNDVA	61	YAFHRFT	15	HQAYSSPYT	16
hu317-4B6, LC	K <u>S</u> <u>S</u> E <u>S</u> SVSNDVA	61	YAFHRFT	15	HQAYSSPYT	16

Примечание: Подчеркнутые AA остатки, по сравнению с мышьиной последовательностью, заменены на последовательности человеческих антител или для улучшения физико-химических свойств.

Таблица 16. Сравнение CDR у разных версий mAb 326

mAb	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
mu326, HC	GYTFTNYGM N	17	WINNNNGEPTYA EEFKG	18	ARDVM DY	19
hu326-1, HC	GYTFTNYGM N	17	WINNNNGEPTYA <u>Q</u> GFRG	62	ARDVM DY	19
hu326-3B1, HC	GYTFTNYGM N	17	WINNNNGEPTYA <u>Q</u> D <u>F</u> RG	62	ARDVM DY	19

hu326-3G1, HC	GYTFTNYGM N	17	WINNNNGEPTYA <u>QDFRG</u>	62	ARDVM DY	19
hu326-4A3, HC	GYTFTNYGM N	17	WINNNN <u>A</u> EPTYA <u>QDFRG</u>	38	ARDVM DY	19
mu326, LC	RASESVDNY GYSFMH	20	RASNLES	21	QQSKE YPT	22
hu326-1, LC	RASESVDNY GYSFMH	20	RASNLES	21	QQSKE YPT	22
hu326-3B1, LC	RASESVDNY GYSFMH	20	RASNLES	21	QQSKE YPT	22
hu326-3G1, LC	RASESVDNY GYSFMH	20	RASNLES	21	QQSKE YPT	22
hu326-4A3, LC	RASESVDNY GYSFMH	20	RASNLES	21	QQSKE YPT	22

Примечание: Подчеркнутые AA остатки, по сравнению с мышиной последовательностью, заменены на последовательности человеческих антител, или для улучшения физико-химических свойств

Таблица 17. Активности связывания гуманизированных mAb, анализируемые ELISA и FACS

mAb	ELISA, EC ₅₀ мкг/мл	FACS, EC ₅₀ мкг/мл
hu317-4B2	0,066	0,129*
hu317-4B5	0,057	0,115*
hu317-4B6	0,061	0,092*
hu326-3B1	0,092	0,165
hu326-3G1	0,088	0,190
hu326-4A3	0,091*	0,142*

* Данные FACS, полученные посредством использования Fab версии антител без нормирования.
** Данные исследования связывания и нормированные.

Таблица 18. Аффинность связывания Fab, анализируемая посредством SPR

Fab	K _{on} (M ⁻¹ , c ⁻¹)	K _{off} (c)	K _D (M)
-----	------------------------------------------------------	----------------------	--------------------

hu317-4B5	$3,89 \times 10^5$	$9,07 \times 10^{-5}$	$2,33 \times 10^{-10}$
hu317-4B6	$5,71 \times 10^5$	$8,37 \times 10^{-5}$	$1,47 \times 10^{-10}$
hu326-3B1	$2,18 \times 10^5$	$1,90 \times 10^{-4}$	$8,70 \times 10^{-10}$
hu326-3G1	$2,00 \times 10^5$	$2,01 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-9}$

Определение аффинности гуманизированных Fab против PD-1 посредством SPR

MAb против PD-1 превращали в Fab версию посредством ПЦР со слиянием переменных областей тяжелых и легких цепей с N-концом человеческого IgG2-CH1 и константной областью каппа-цепи, соответственно, и субклонировали в вектор pcDNA3.1 (Invitrogen). Оба экспрессионных вектора совместно экспрессировали в клетках 293-F, используя протокол временной трансфекции, подобно временной экспрессии полноразмерных антител. Кратко, каппа-цепь Fab амплифицировали посредством ПЦР и субклонировали в экспрессионный вектор на основе pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, США). В отдельной плазмиде переменную область тяжелой цепи (VH) вместе с CH1 кодирующей последовательностью от человеческого IgG2 сливали с C-концевой с-Мус-His8 меткой посредством ПЦР с перекрывающимися праймерами, и затем субклонировали в экспрессионный вектор. Мутации C232S и C233S (нумерация остатков по Kabat, Kabat et al. Sequence of proteins of immunologic interest, 5th ed Bethesda, MD, NIH 1991) вводили в тяжелую цепь IgG2 для предотвращения замены дисульфидной связи и стабилизации человеческого IgG2 в конформации IgG2-A (Lightle et al. 2010 Protein Sci 19(4): 753-762). Обе конструкции содержали сигнальный пептид, расположенный выше зрелых последовательностей Fab. Секретируемой экспрессии Fab достигали посредством совместной трансфекции клеток 293-F более чем 2 плазмидами, и супернатанты клеточной культуры собирали через 6-7 суток после трансфекции. His8-меченные Fab очищали от супернатантов клеточной культуры, используя колонку Ni-sepharose Fast Flow (кат. № 17531801, GE Life Sciences) с последующей эксклюзионной хроматографией, используя колонку HiLoad 16/60 Superdex200 (кат. № 17106901, GE Life Sciences). Очищенные Fab концентрировали до 0,5-5 мг/мл в PBS и хранили в аликвотах в морозильной камере при -80°C.

Для определения аффинности Fab против PD-1 использовали анализы SPR с прибором BiacoreTM T-200 (GE Life Sciences). Кратко, PD-1/His человека или PD-1/His яванского макака соединяли с активированными биосенсорными чипами CM5 (кат. № BR100530, GE Life Sciences) с достижением приблизительно 100-200 единиц ответа (RU) с последующим блокированием непрореагировавших групп 1M этаноламином. Образцы

Fab с возрастающей концентрацией от 0,12 нМ до 90 нМ инъецировали в подвижном буфере SPR (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween20, pH 7,4) при 30 мкл/минута, и ответы на PD-1/His человека или PD-1/His обезьяны в виде связывания рассчитывали посредством вычитания RU из холостой проточной ячейки. Константы скорости ассоциации (k_{on}) и константы скорости диссоциации (k_{off}) рассчитывали, используя однозначную модель связывания Ленгмюра (BIA Evaluation Software, GE Life Sciences). Равновесную константу диссоциации (K_d) рассчитывали в виде отношения k_{off}/k_{on} .

Аффинности связывания Fab против PD-1, определенные SPR, перечислены в Таблице 18. Каждый Fab против PD-1 связывался с PD-1 человека с высокой аффинностью ($K_d = 0,15-1$ нМ). Все Fab, за исключением 326-3G1, связывались с PD-1 яванского макака с немного более низкими, но сопоставимыми (в 5-кратных пределах в отношении K_d) аффинностями.

Пример 8. Создание и экспрессия рекомбинантных mAb против PD-1 с модифицированной константной областью человеческого IgG4

Так как PD-1 в основном экспрессируется в активированных Т-клетках, считается, что PD-1-блокирующие антитела, связанные с встречающимся в природе типом группировок IgG- γ Fc, индуцируют γ Fc-опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC и CDC, в разной степени, в зависимости от подклассов IgG, что приводит к элиминации активированных Т-клеток (Natsume A, et al, 2009 Drug Des Devel Ther. 3: 7–16). Во многих предыдущих исследованиях было показано, что подкласс антител человека IgG4 имеет умеренную ADCC и почти не обладает эффекторной функцией CDC (Moore GL, et al. 2010 MAbs, 2:181-189). С другой стороны, было обнаружено, что встречающийся в природе IgG4 менее стабилен в стрессовых условиях, например, в кислотном буфере или в условиях возрастающей температуры (Angal, S. 1993 Mol Immunol, 30:105-108; Dall'Acqua, W. et al, 1998 Biochemistry, 37:9266-9273; Aalberse et al. 2002 Immunol, 105:9-19). Для того чтобы уберечь PD-1⁺ Т-клетки от уничтожения и для улучшения физико-химических свойств антител к PD-1, гуманизированные mAb связывали с IgG4, сконструированным посредством комбинаций мутаций для получения пониженных или нулевых активностей связывания с Fc γ R или C1q, таким образом, ослабляя или устраняя эффекторные функции ADCC и CDC. Рассматривая физико-химические свойства антитела в качестве биологического лекарственного средства, одним из менее желательных, присущих IgG4 свойств является динамическое разделение его двух тяжелых цепей в растворе с образованием половины антитела, что приводит к биспецифичным антителам, созданным *in vivo* с помощью способа, называемого “замена Fab-фрагмента” (Van der Neut

Kolfshoten M, et al. 2007 Science, 317:1554-157). Мутация серина до пролина в положении 228 (система нумерации EU) оказалась ингибирующей в отношении разделения тяжелых цепей IgG4 (Angal, S. 1993 Mol Immunol, 30:105-108; Aalberse et al. 2002 Immunol, 105:9-19). Сообщалось, что некоторые из аминокислотных остатков в шарнире и γ Fc области оказывают влияние на взаимодействие антител с Fc γ рецепторами (Chappel SM, et al. 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9036-9040; Mukherjee, J. et al., 1995 FASEB J, 9:115-119; Armour, K.L. et al., 1999 Eur J Immunol, 29:2613-2624; Clynes, R.A. et al., 2000 Nature Medicine, 6:443-446; Arnold J.N., 2007 Annu Rev Immunol, 25:21-50). Кроме того, с некоторыми редко встречающимися изоформами IgG4 в человеческой популяции можно также добиться разных физико-химических свойств (Brusco, A. et al. 1998 Eur J Immunogenet, 25:349-55; Aalberse et al. 2002 Immunol, 105:9-19). Однако объединение всех мутаций и изоформ, ранее открытых в специфичном антителе, не гарантирует идеальную молекулу антитела, которая имеет все признаки терапевтического средства, такие как описано выше, что может быть результатом эффекта противоречия комбинированных мутаций и влияния вариабельной области на эффекторную функцию и физико-химические свойства антитела (Igawa T. et al., 2010 Prot Eng Design Select, 23:385-392; Perchiacca J.M. and Tessier P.M., 2012 Ann Rev Biomol Eng 3:263-286).

Для создания mAb против PD-1 с самой низкой ADCC, CDC и нестабильностью авторы изобретения модифицировали шарнирную и γ Fc область человеческого IgG4 посредством введения ряда комбинаций мутаций, что привело к созданию IgG4mt1-IgG4mt12. Некоторые из модифицированных вариантов IgG4 были явно менее желательными, что отражают результаты анализа, проведенного авторами изобретения, несколько значимых вариантов IgG4 и модифицированных последовательностей перечислены в Таблице 19. Оценка данных антител описана в данном документе.

Таблица 19. Модификации последовательностей вариантов IgG4

IgG4 и варианты	Аминокислотные последовательности*																
	...	228	229	230	231	232	233	234	235	236	...	265	...	309	...	409	...
IgG4	...	S	C	P	A	P	E	F	L	G	...	D	...	L	...	R	...
IgG4mt1	...	P	C	P	A	P	E	F	L	G	...	D	...	L	...	R	...
IgG4mt2	...	P	C	P	A	P	P	V	A	G	...	D	...	L	...	R	...
IgG4mt6	...	P	C	P	A	P	P	V	A	G	...	A	...	L	...	R	...
IgG4mt8	...	P	C	P	A	P	P	V	A	G	...	T	...	L	...	R	...
IgG4mt9	...	P	C	P	A	P	P	V	A	G	...	A	...	L	...	K	...

IgG4mt10	...	<u>P</u>	C	P	A	P	<u>P</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	G	...	<u>A</u>	...	<u>V</u>	...	<u>K</u>	...
* Нумерация аминокислот основана на системе EU. Замены выделены посредством подчеркивания																	

Пример 9. IgG4mt10 характеризуется отсутствием связывания с FcγR, имеет самую слабую ADCC и CDC эффекторную функцию

Инициирование ADCC происходит, когда антитело связывается с целевым белком поверхности клетки с последующим лигированием с рецепторами Fcγ (FcγR), экспрессируемыми на эффекторных клетках. Документально доказано, что человеческий IgG1 обладает значительно более высокой, чем IgG2 и IgG4, аффинностью связывания с FcγR, особенно с FcγR-I и FcγR-IIIa, что соотносилось с силой активирования IgG1 ADCC. Напоминая ADCC, CDC активируется, когда антитело поперечно связывается с мишенью поверхности клетки и белком C1q с последующей каскадной реакцией образования комплекса комплемента и лизисом клетки-мишени. По аналогии с ADCC и CDC, анализы связывания антитела с FcγR и C1q могут служить фундаментальным показателем ADCC и CDC. Вследствие этого, авторы изобретения систематически оценивали связывание mAb со всеми основными FcγR.

Связывание с FcγR

Связывание различных мутантов IgG4 с FcγR определяли посредством проточной цитометрии. Кратко, создавали серию трансфектантов HEK293, экспрессирующих FcγR человека. Данные трансфектанты экспрессировали FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb или FcγRIIIa. Мульти-субъединичные FcγR (т.е. FcγRI и FcγRIIIa) совместно экспрессировались с FcRγ. Полиморфные варианты (т.е. FcγRIIa H131 и R131, FcγRIIIa F158 и V158) были также включены. Вторичное антитело (антитело козы против F(ab)² человеческого IgG, конъюгированное с Alexa Fluor 488, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, США) использовали для выявления связывания mAb против PD-1 с модифицированными вариантами IgG4 (Таблица 19) с клетками FcγR⁺ HEK293. Как ожидалось, mAb против PD-1 в формате IgG1 (hu317-1/IgG1 и hu317-4B6/IgG1) хорошо связываются со всеми FcγR, включая FcγRI, FcγRIIa (H131 и R131 аллели), FcγRIIb и FcγRIIIa (V158 и F158 аллели) (Таблица 20). Интересно, что, когда две разные версии гуманизированных mAb, hu317-1 и hu317-4B6 (с различиями как в V_h, так и V_k) создавали в одном и том же формате варианта IgG4, например, либо в формате IgG4mt1, либо в формате IgG4mt6, их сила связывания (MFI) варьируется в интервале от двух кратной до близко к 100 кратной (например, 455,2/115,7 = 3,9 раза; 13,6/1,0 = 13,6 раза; 434,6/4,9 = 88,7 раза; и т.д., см.

Таблицу 20). Это согласуется с результатами, полученными ранее, согласно которым переменные области антител действительно оказывают значительное влияние на связывание с FcR, вследствие этого, оказывая воздействие на эффекторную функцию, такую как ADCC (Igawa T. et al., 2010 Prot Eng Design Select, 23:385-392; Perchiacca J.M. and Tessier P.M., 2012 Ann Rev Biomol Eng 3:263-286).

Как показано в Таблице 20, когда hu317-4B6 и hu326-4A3 были созданы в формате IgG4mt10, они обладали самой низкой активностью связывания с FcγR среди mAb против PD-1 и форматов вариантов IgG, перечисленных в таблице, а также многих других гуманизированных mAb и форматов IgG, протестированных в данном исследовании. Уникальность hu317-4B6 и hu326-4A3 формата IgG4mt10 в этом отношении не может быть распространена на такое же семейство гуманизированных mAb с в некоторой степени отдаленной гомологией последовательностей, например, hu317-1, как описано выше.

Таблица 20. Сила связывания (MFI*) mAb против PD-1 с FcγR, определенная с помощью FACS

mAb	FcγRI	FcγRIIA (H131)	FcγRIIA (R131)	FcγRIIB	FcγRIIA (F158)	FcγRIIA (V158)
hu317-1 /IgG1	2152,9	168,7	139,6	442,4	99,7	277,2
hu317-4B6 /IgG1	2771,7	1,7	0,6	1,9	28,0	293,7
hu317-1 /gG4mt1	455,2	21,3	21,9	434,6	0,6	20,7
hu317-4B6 /IgG4mt1	115,7	0,2	0,0	4,9	0	6,1
hu317-1 /IgG4mt6	13,6	1,0	0,8	1,8	0,9	1,1
hu317-4B6 /IgG4mt6	1,0	0	0	0	0	0
hu317-4B6 /IgG4mt10	0,4	0	0	0	0	0
hu326-4A3 /IgG4mt10	0,5	0	0	0	0	0

* MFI: средняя интенсивность флуоресценции из анализа FACS

ADCC

Классическая ADCC подразумевает активацию NK-клеток посредством антител, связывающихся с FcγRIIIА или CD16. Для подтверждения того, индуцируют ли гуманизированные mAb против PD-1 ADCC, клетки NK92MI/CD16V, которые были созданы из клеток NK92MI (ATCC) посредством совместной трансдукции экспрессионных плазмид, содержащих гены CD16 (V158 аллель) и FcRγ, использовали в качестве эффекторных клеток, и PD-1-экспрессирующую линию Т-клеток, HuT78/PD-1, использовали в качестве клеток-мишеней. Клетки NK92MI/CD16V (4×10^4) совместно культивировали с равным количеством клеток HuT78/PD-1 в 96-луночных планшетах с V-образным дном в течение 5 ч. Цитотоксичность определяли посредством анализа высвобождения LDH, описанного в предыдущем разделе. Результаты подтвердили, что все hu317-4B2/IgG4mt6, hu317-4B6/IgG4mt6, hu317-4B6/IgG4mt10 и hu326-4A3/IgG4mt10 имеют базовый уровень ADCC, по сравнению с положительными контролями (Фиг. 7). Незначительное различие в ADCC между теми 4 mAb можно объяснить экспериментальной ошибкой (см. планки погрешностей на Фиг. 7).

CDC

Человеческие антитела IgG4, в общем, не индуцируют какую-либо CDC по классическому пути. Будут ли mAb против PD-1 в формате IgG4mt10 запускать CDC оценивали, используя PD-1-экспрессирующую линию Т-клеток, Hut78/PD-1, и свежую сыворотку человека от здоровых доноров. Лизис клеток в результате CDC определяли с помощью наборов для анализа Celltiter glo (Promega, Пекин, Китай). Кратко, клетки HuT78/PD-1 (2×10^4) инкубировали в RPMI1640, не содержащей сыворотку (Invitrogen), с Ab против PD-1 (10 мкг/мл) при 37°C в течение 15 минут перед добавлением сыворотки здорового человека (NHS) до конечной концентрации 15% или 50% в 96-луночных плоскодонных планшетах в общем объеме 120 мкл. После инкубации в течение ночи при 37°C клетки подвергали лизису и анализировали в отношении концентрации АТФ. Для тестирования того, могут ли гуманизированные mAb против PD-1 в IgG4mt10 уничтожать PD-1⁺ первичные Т-клетки в результате CDC, МКПК, выделенные из здоровых доноров, предварительно культивировали с Ab ОКТ3 против CD3 (40 нг/мл) в течение 3 суток перед совместным культивированием с Ab против PD-1 и NHS. Количество АТФ прямо пропорционально числу клеток, находящихся в культуре. Флуоресценцию считывали, используя 96-луночный флуориметр (PHERA Star FS, BMG LABTECH). Результаты

выражены в относительных единицах флуоресценции (RFU), что пропорционально числу жизнеспособных клеток. CDC активность, выраженную в процентах, рассчитывали следующим образом: % CDC активность = $[(\text{RFU тест} - \text{RFU фон}) / (\text{RFU при полном лизисе клеток} - \text{RFU фон})] \times 100$. В общем, авторы изобретения не смогли выявить какую-либо ADCC, опосредованную mAb против PD-1 в формате IgG4mt10, которые связываются с активированными МКПК. В гиперчувствительных экспериментальных условиях, например, при использовании линии клеток с высоким уровнем экспрессии PD-1, высокой концентрации сыворотки и антител, авторы изобретения выявляли очень низкий уровень CDC в некоторых случаях, и не существует больших различий между разными версиями и mAb против PD-1, что указывает на то, что mAb против PD-1 в форматах вариантов IgG4 сохраняли низкий уровень CDC активности или ее отсутствие, как и обычная форма IgG4.

Пример 10. Гуманизированные mAb против PD-1 в формате IgG4mt10 обладают повышенной стабильностью в стрессовых условиях

Стабильность антител к PD-1 в условиях высокой температуры и кислотных условиях

Все антитела к PD-1, используемые для исследований стабильности, очищали на колонке с белком А с последующей эксклюзионной хроматографией (SEC), как описано в предыдущих разделах. После очистки содержания агрегатов очищенных образцов антител отслеживали с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии-высокоэффективной жидкостной хроматографии (SEC-HPLC), которые попадали в интервал 0%-0,5%.

Во время анализа SEC-HPLC образцы антител анализировали использованием колонки TSKgel G3000 SWXL (7,8x300 мм, кат. № 08541, Tosoh Bioscience, Шанхай, Китай) в условиях изократического элюирования (элюирующий буфер 0,2 М фосфат натрия, pH 7,2) и с последующим детектированием при УФ (ультрафиолетовое излучение) - 215 нм. В каждом запуске 10 микролитров образца антител загружали на колонку и элюировали при скорости потока 1 мл/минута. Димерные формы или большие по размеру формы агрегатов антитела отделяли от мономерных форм, и процентное содержание димеров и агрегатов определяли на основе интегральных площадей пиков под УФ-кривыми.

Для исследования стабильности в условиях ускоренного старения антитела к PD-1 (10-40 мг/мл в PBS) держали в инкубаторах при 40-50°C в течение 4-7 суток для тестирования стабильности антител в условиях высокой температуры. Затем образцы антител анализировали в отношении индуцированного теплом образования димеров и

агрегатов в SEC-HPLC. Для каждого анализируемого антитела к PD-1 менее 2% становилось формами с более высокой молекулярной массой (димерами и агрегатами), указывая на то, что антитела к PD-1 обладали высокой стабильностью в условиях высоких температур.

Стабильность антитела в кислотных условиях была ключевой проблемой в последующем технологическом процессе (Liu et al. 2010 mAbs 2:480-499). Элюирование антител с белка А и инактивация вируса обычно требуют инкубации антитела в условиях низкого pH (2,5-4). Однако такие кислотные условия могли потенциально вызывать денатурацию и агрегирование антител. Известно, что человеческий IgG4 является менее стабильным, чем IgG1 и IgG2 (2002 Immunology 105:9). Вследствие этого, авторы изобретения анализировали гуманизированные mAb, полученные с разными мутантными формами IgG4. Кратко, стабильности антител в условиях низкого pH исследовали, используя объем каждого образца антитела (10 мг/мл в PBS), смешанный в соотношении 1:1 с буферами с низким pH, содержащими 50 мМ цитрат натрия, 100 мМ NaCl при pH 3,6, 3,3, 3,0 или 2,7, соответственно. Спустя 1 час инкубации при комнатной температуре, образцы антител в условиях низкого pH нейтрализовали посредством разведения 1:5 в элюирующем буфере SEC-HPLC, содержащем 0,2 М фосфат натрия, pH 7,2. Анализы SEC-HPLC проводили, как описано выше, и количественно определяли процентные содержания димеров и агрегатов, обусловленных низким уровнем pH. MAb против PD-1 317-4B6 в формате IgG1 оказалось наиболее стабильным в биотехнологически релевантных кислотных условиях, даже когда значение pH становилось всего лишь 2,7. Среди mAb против PD-1, полученных в нескольких вариантах IgG4, hu317-4B6/IgG4mt10 и hu326-4A3/IgG4mt10 являлись наиболее стабильными в условиях кислотного буфера (Таблица 21), так как уровень агрегатов, образование которых было вызвано кислотными условиями, был значительно снижен до уровня, который сопоставим с уровнем агрегатов формата IgG1 mAb против PD-1, 317-4B6 и 326-4A3, то есть уровень растворимых агрегатов составляет меньше чем 2% (Таблица 21).

Таблица 21. Димеры и растворимые агрегаты, образованные в кислотных буферах и анализируемые посредством SEC-HPLC

mAb против PD-1	% димеров и агрегатов				
	pH 7,2	pH 3,6	pH 3,3	pH 3,0	pH 2,7
317-4B6/IgG1	0,0%	0,0%	0,2%	0,1%	0,2%

317-4B6/IgG4mt1	0,0%	1,0%	11,0%	49,0%	48,0%
317-4B6/IgG4mt3	0,0%	13,0%	31,0%	больше 50%	больше 50%
317-4B6/IgG4mt6	0,0%	4,0%	41,0%	больше 50%	больше 50%
317-4B6/IgG4mt9	0,0%	0,5%	2,1%	3,3%	2,0%
317-4B6/IgG4mt10	0,0%	0,2%	0,6%	0,6%	1,4%
326-4A3/IgG4mt10	0,0%	0,0%	0,4%	0,5%	1,2%

Пример 11. Картирование эпитопов связывания mAb против PD-1

Предыдущие исследования кристаллических структур комплексов PD-1/PD-L1 и PD-1/PD-L2 пролили свет на понимание важнейших аминокислотных (AA) остатков на PD-1, которые требуются для связывания лиганда (Zhang et al. 2004 Immunity, 20:337-347; Lin D.Y. et al. 2008 PNAS 105:3011-3016; Lazar-Molnar E. et al. 2008 PNAS, 105:10483-10488). Фактически, шесть из таких AA остатков, которые необходимы для PD-L1-связывания, были идентифицированы на рецепторе в результате анализа точечных мутаций. Пять из данных шести AA остатков также требовались для PD-L2-связывания (Lin D.Y. et al. 2008 PNAS 105:3011-3016). На основе информации анализа структурно-направленных мутаций, авторы изобретения предположили, что наиболее эффективным путем для блокирования функциональными mAb PD-1-опосредованной сигнализации является конкуренция с лигандами PD-1 посредством связывания с шестью важнейшими AA остатками, вследствие чего, эпитопы связывания, требуемые для связывания лигандов, оказываются занятыми. Для исследования данной гипотезы и для понимания механизма действия функциональных антител к PD-1 авторы изобретения создали шесть мутантов PD-1 посредством замещения каждой из шести важнейших AA на Ala, по отдельности, т.е. K45A, I93A, L95A, P97A, I101A и E103A (нумерация AA остатков на основе Lin D.Y. et al. 2008 PNAS 105:3011-3016). Мутантные PD-1/Fc и PD-1/His (Фиг. 1) использовали в качестве матриц для ПЦР-направленного мутагенеза или мутагенеза по типу катящегося кольца с использованием Fast Mutagenesis System (кат. № FM111, Transgen Biotech, Пекин, Китай). Все мутанты субклонировали в экспрессионные векторы по изобретению на основе pcDNA и проверяли посредством секвенирования. Мутантные PD-1 белки и PD-1 белки дикого типа экспрессировали посредством временной трансфекции (описанной в Примере 1) и получали спустя 4-6 суток культивирования. Кондиционированные среды (CM) анализировали посредством Вестерн-блоттинга для

подтверждения экспрессии PD-1-белка с точки зрения качества и количества. Супернатанты (СМ), после очистки от продуктов разрушения клеток, непосредственно использовали в анализе ELISA или Вестерн-блоттинге для картирования эпитопов.

Для исследования эпитопов связывания гуманизированных mAb против PD-1 анализы ELISA с использованием PD-1 дикого типа (WT) и мутантного PD-1 (Mt) проводили для оценки активностей связывания hu317-4B5, hu317-4B6, hu326-3B1 и hu326-4A3. Для сравнения, для того, чтобы проверить уникальность сигнатурной связывающей последовательности антител, в исследование включали два эталонных антитела (эталонное Ab-1 и эталонное Ab-2 из US8008449B2 и US8168757B2, соответственно). Осуществляли покрытие равным объемом СМ, содержащей WT или Mt PD-1, в 96-луночном планшете для всех mAb в том же анализе ELISA. Все результаты ELISA нормировали, используя средние результаты ELISA считывания сигналов связывания с WT PD-1 в качестве стандарта. Сигналы связывания ELISA с конкретным Mt PD-1 дополнительно нормировали по самому высокому показанию считывания сигнала связывания антитела (задано как 100%) с конкретным Mt PD-1. Для удобства анализа данных, когда сигнал связывания ELISA mAb в отношении конкретного мутанта падал ниже 50% относительно PD-1 WT, это свидетельствовало о том, что аминокислотный остаток представляет собой значимый эпитоп связывания, мутация которого значительно подавляет связывание антител. Подобным образом, если сигнал связывания ELISA mAb в отношении конкретного мутанта падал ниже 25%, аминокислотный остаток определяли, как очень значимый. Как показано на Фиг. 8, два важнейших AA остатка в PD-1, K45 и I93, представляют собой значимый или очень значимый эпитопы для связывания mAb hu317-4B5 и hu317-4B6, и три AA остатка, I93, L95 и P97, представляют собой либо значимые, либо очень значимые эпитопы для hu326-3B1 и hu326-4A3. С другой стороны, два данных эталонных антитела имеют характерные эпитопы связывания, P97 является значимым для эталонного Ab-1, в то время как L95 и P97 являются значимыми для эталонного Ab-2.

Интересно, что когда белок PD-1 денатурировал в Вестерн-блоттинге, mAb hu317-4B5 и -4B6 все еще были способны связываться с WT PD-1, хотя важнейшие эпитопы связывания (K45 и I93) не находятся близко друг к другу (нелинейные). Это указывало на то, что белок PD-1 становился до некоторой степени ренатурированным после денатурации в SDS-PAGE (полиакриламидный гель в присутствии додецилсульфата натрия) метода Вестерн-блоттинга, что позволяет mAb против PD-1 узнавать его и связываться с ним. Пользуясь данным наблюдением, авторы изобретения проводили анализ Вестерн-блоттинга для всех шести антител, используемых в описанном выше

исследовании ELISA. Суммарные результаты Вестерн-блоттинга прекрасно соответствовали результатам ELISA, т.е. значимые или очень значимые эпитопы, мутации которых приводили к слабым сигналам связывания в ELISA, также давали самую слабую полосу Вестерн-блоттинга, по сравнению со связыванием с другим мутантным PD-1 (Фиг. 8). Также наблюдали некоторые незначительные различия между ELISA и Вестерн-блоттингом, например, сигналы связывания в ELISA на I93A и E103A эталонным Ab-2 были относительно сильнее, чем сигналы связывания в Вестерн-блоттинге. Это может быть показателем того, что те AA остатки, мутации которых влияли на связывание, могут также способствовать связыванию, однако только в стрессовых условиях (то есть денатурация или потеря нативной конформации). Как представлено в Таблице 22, mAb против PD-1 в данном изобретении имеют опознаваемые эпитопы связывания, отличающиеся от другого антитела к PD-1.

Таблица 22. Краткое изложение ключевых эпитопов связывания mAb против PD-1

	K45A	I93A	L95A	P97A	I101A	E103A
hu317-4B5	***	**				
hu317-4B6	***	**				
hu326-3B1		**	**	**		
hu326-4A3		***	**	**		
Эталон. Ab-1				**		
Эталон. Ab-2			**	**		
* на основе Фиг. 8						

Пример 12. mAb против PD-1 активируют первичные МКПК человека и ингибируют рост опухоли в моделях ксенотрансплантата у мышей

Гуманизированные mAb против PD-1 активируют МКПК человека

В процессе гуманизации гуманизированные mAb против PD-1 на разных стадиях сохраняли похожие функциональные активности, как показали результаты анализов ELISA, FACS и анализов высвобождения цитокинов на основе клеток иммунной системы. Для подтверждения функции конечных версий гуманизированных mAb авторы изобретения анализировали активирующие функции hu317-4B5, hu317-4B6, hu326-3B1 и hu326-4A3, используя первичные МКПК человека. Результаты показали, что эти mAb на протяжении гуманизации поддерживали функции исходных мышинных mAb с активацией

первичных МКПК, хотя степень активации различается у четырех доноров вследствие расхождения генетического фона индивидуума (Фиг. 9).

Гуманизированные mAb против PD-1 усиливают цитотоксичность, опосредованную НК-клетками, в отношении раковых клеток

Напоминая исходные мышинные mAb, гуманизированные mAb против PD-1, hu317-4B5, hu317-4B6, hu326-3B1 и hu326-3G1, усиливают цитотоксичность, опосредованную клетками NK92MI/PD-1, в отношении клеток-мишеней рака легкого, SK-MES-1/PD-L1, дозозависимым образом (Фиг. 10, Таблица 23). Казалось очевидным, что в принципе гуманизированные mAb против PD-1 могут функционировать, нарушая иммунологическую толерантность, опосредованную PD-1 сигнализацией, усиливая активность уничтожения раковых клеток клетками иммунной системы, например, НК-клетками и цитотоксичными Т-лимфоцитами.

Гуманизированное mAb против PD-1 активирует МКПК человека и ингибирует рост опухоли в модели ксенотрансплантата опухоли у мышей *in vivo*

Все приведенные выше экспериментальные данные показали, что mAb против PD-1 могли бы работать в мышинных раковых моделях, используя мышей с ослабленным иммунитетом с ксенотрансплантацией раковых клеток человека с последующей имплантацией МКПК человека и применением обработки mAb для ингибирования роста раковых клеток *in vivo*. Эксперимент планировали следующим образом. Самцам мышей с SCID (тяжелым комбинированным иммунодефицитом) возраста семь-восемь недель (Vital River Laboratories, Китай) в правый бок посредством прививки подкожно вводили 3×10^6 клеток Hep3B/OS8-PD-L1 в 50% Matrigel (BD Biosciences, New Jersey, США). Спустя пятнадцать суток после инокуляции опухолевых клеток, мышей, несущих опухоль размером 100-250 мм³, рандомизировали и разделяли на три экспериментальные группы. Сто микролитров объединенных МКПК (5×10^5) от 2 здоровых доноров инъецировали внутрь опухоли. Спустя трое суток после МКПК-имплантации п.к. (подкожно) вводили антитела к PD-1 (Hu317-IgG4mt2) и человеческий IgG при дозе 10 мг/кг, соответственно. Обработку антителами повторяли один раз каждые 10 суток, всего 3 раза. PBS инъецировали в параллельной группе в качестве отрицательного контроля. Опухоли измеряли дважды в неделю, используя калипер, начиная с 7 суток. Объемы опухолей рассчитывали, используя следующую формулу: $[D \times (d^2)]/2$, в которой D представляет собой большой диаметр опухоли и d представляет собой малый диаметр. Все

исследования животных проводили, следуя регламенту по уходу за животными и их использованию *Beigene*.

В исследовании *in vivo*, несмотря на то, что 60% опухолей в контрольных группах саморегрессировали, остальная часть эксперимента *in vivo* все еще являлась довольно информативной, что представлено на Фиг.11. В каждой из контрольных групп, либо в группе, обработанной носителем, либо в группе, обработанной человеческим IgG (huIgG), имеется 40% опухолей (2 из 5 мышей), перерастающих объем исходного уровня в начальной точке. Две опухоли в группе, обработанной PBS, росли до гораздо большего объема (больше 2000 мм³, причем исследование на мыши, несущей одну опухоль, завершали досрочно вследствие выхода за пределы размера опухоли по протоколу). Данные две опухоли в группе, обработанной huIgG, выросли до размера 800 и 1370 мм³, значительно превышающего средний исходный уровень 164 мм³, хотя и меньшего, чем в случае опухолей, обработанных PBS. С другой стороны, в группе, обработанной mAb против PD-1 (hu317-1/IgG4mt2), опухоли либо полностью регрессировали, либо по размеру были близки к исходному уровню (одна опухоль = 200 мм³, которая медленно выростала обратно после регрессии до 50% от исходного уровня, спустя две недели с момента МКПК имплантации). Результаты показали, что mAb против PD-1, описанное выше, может активировать клетки иммунной системы человека, ингибируя рост опухолевых клеток в мышинной модели опухоли *in vivo*, что согласуется с экспериментальными результатами *in vitro*, описанными выше.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полинуклеотид, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфично связывается с PD-1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область (CDR) 1 тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 31, CDR2 тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 32 и CDR3 тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 33.
2. Полинуклеотид по п. 1, дополнительно кодирующий вариабельную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 легкой цепи согласно SEQ ID NO: 34, CDR2 легкой цепи согласно SEQ ID NO: 35 и CDR3 легкой цепи согласно SEQ ID NO: 36.
3. Полинуклеотид по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 24 и вариабельную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 26.
4. Полинуклеотид по п. 1, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 23.
5. Полинуклеотид по п. 2, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 25.
6. Полинуклеотид по п. 5, содержащий SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 25.
7. Полинуклеотид по п. 1, где антитело представляет собой моноклональное антитело.
8. Полинуклеотид по п. 7, где моноклональное антитело имеет тяжелую цепь IgG4.
9. Полинуклеотид, кодирующий гуманизованное моноклональное антитело, которое связывается с PD-1, где антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, содержащую вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 24 и Fc область тяжелой цепи IgG4 с SEQ ID NO: 88, и аминокислотную последовательность легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность С-области легкой цепи каппа Ig, депонированной как учетный № NCBI P01834, и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 26.
10. Гуманизованное моноклональное антитело, связывающее PD-1, содержащее: вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 24, Fc область тяжелой цепи IgG4 с SEQ ID NO: 88, С-область легкой цепи каппа Ig, депонированной как учетный № NCBI P01834, и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 26.
11. Гуманизованное моноклональное антитело, связывающее PD-1, по п. 10,

где антитело состоит из: переменной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 24, Fc области тяжелой цепи IgG4 с SEQ ID NO: 88, C-области легкой цепи каппа Ig, депонированной как учетный № NCBI P01834, и переменной области легкой цепи с SEQ ID NO: 26.

12. Экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид по п. 1.

13. Экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид по п. 2.

14. Клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор по п. 12.

15. Клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор по п. 13.

16. Клетка-хозяин по п. 14, дополнительно содержащая экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 34, CDR2 легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 35, и CDR3 легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 36.

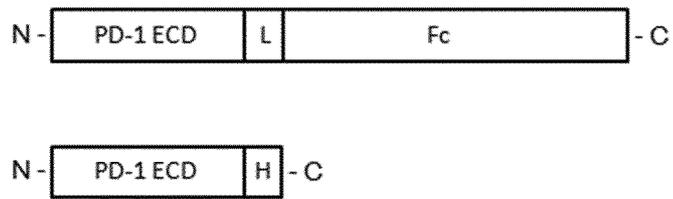
17. Способ получения антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий: культивирование клетки, содержащей одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область (CDR) 1 тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 32, CDR3 тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 33, CDR1 легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 34, CDR2 легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 35, и CDR3 легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 36, в условиях, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируются; и выделения указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

18. Способ по п. 17, где тяжелая цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента кодируется в первом экспрессионном векторе в клетке, и легкая цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента кодируется во втором экспрессионном векторе в клетке.

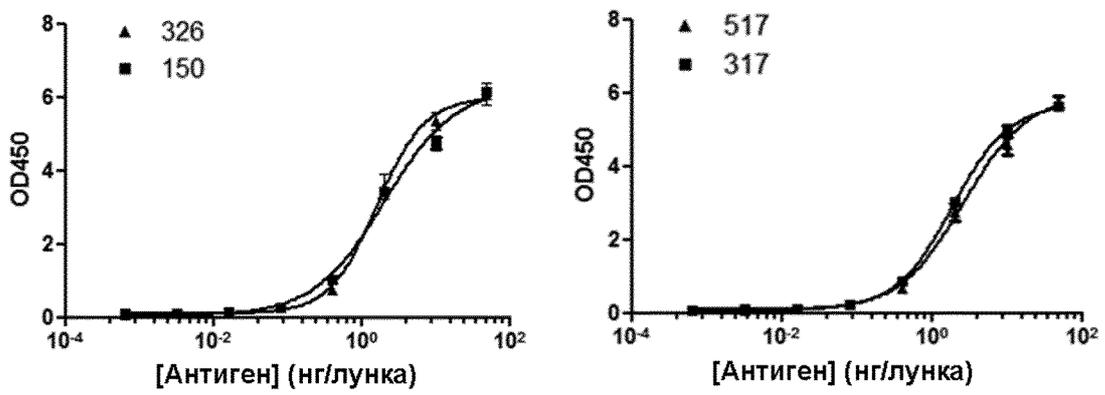
19. Способ по п. 17, где тяжелая цепь и легкая цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента кодируются в одном и том же экспрессионном векторе.

20. Способ по п. 17, дополнительно включающий очистку антитела или его фрагмента после выделения антитела.

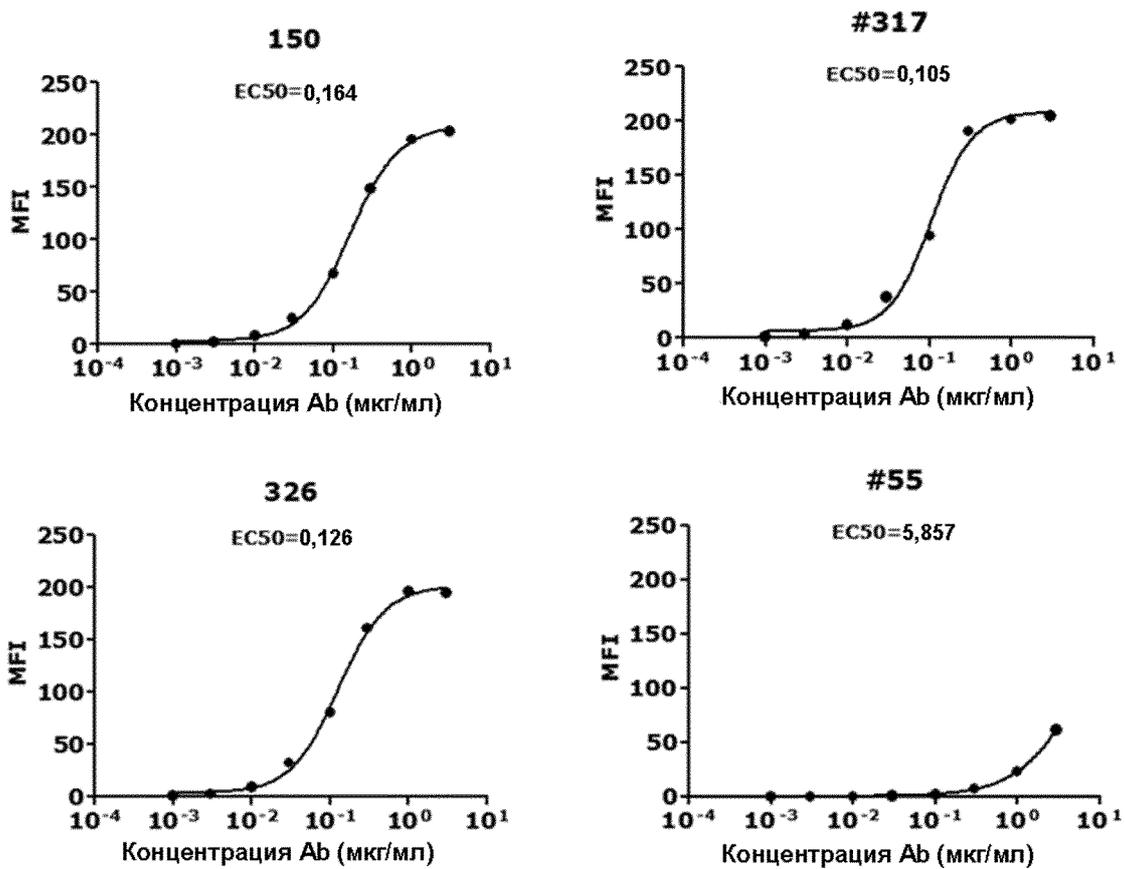
Фиг. 1



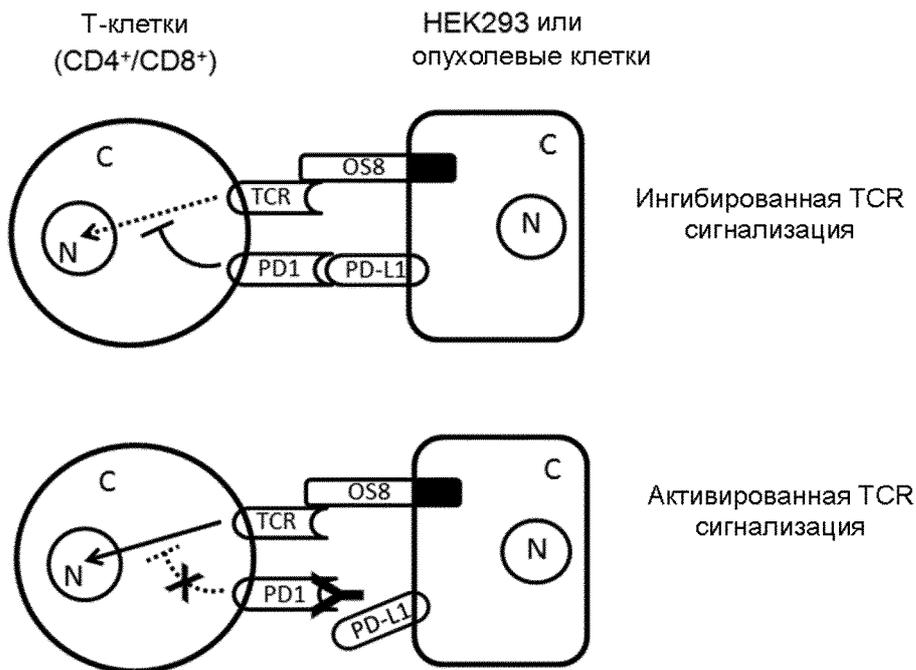
Фиг. 2



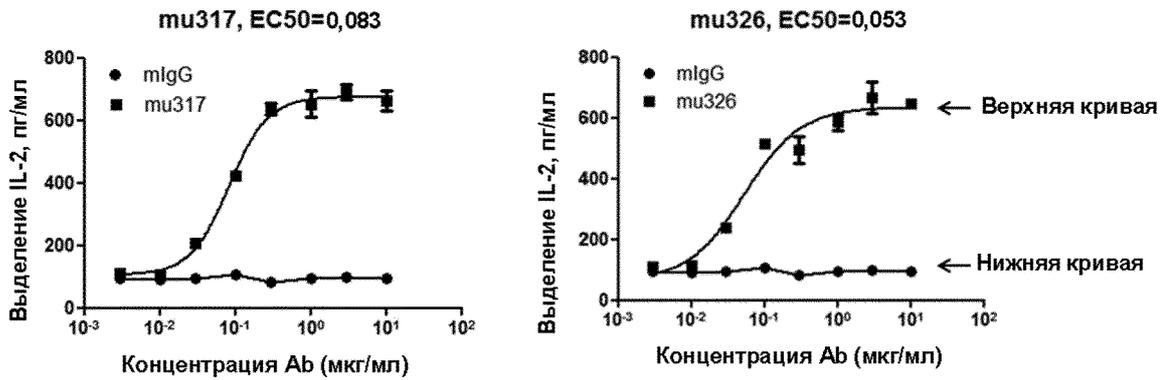
Фиг. 3



Фиг. 4

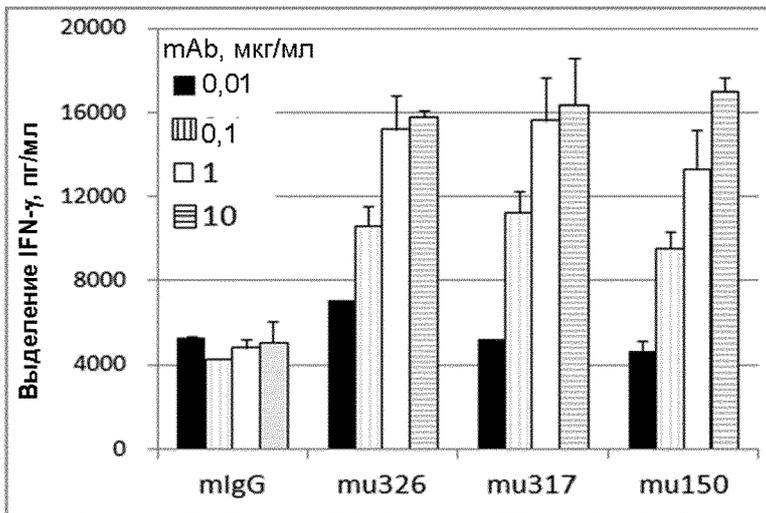


Фиг. 5

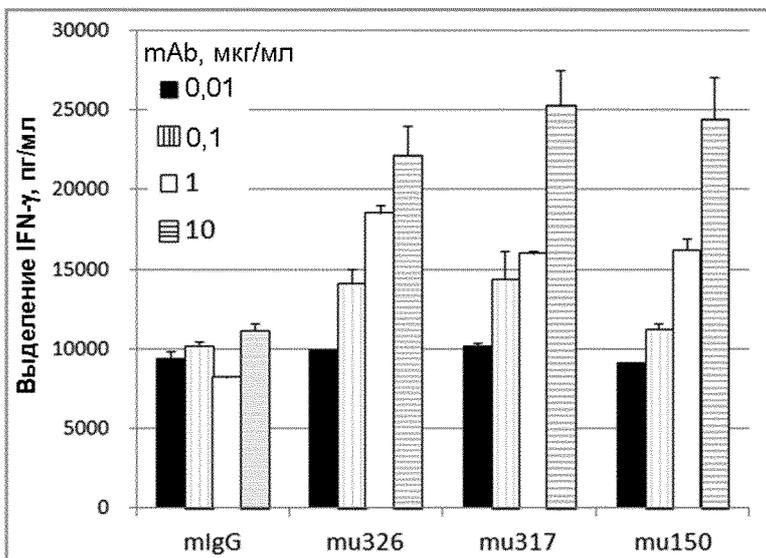


Фиг. 6

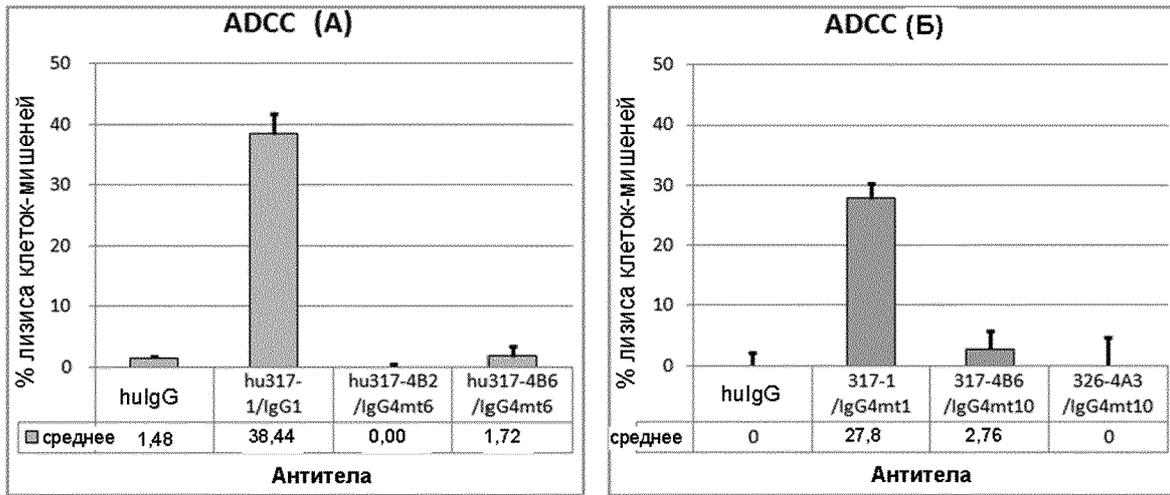
(A)



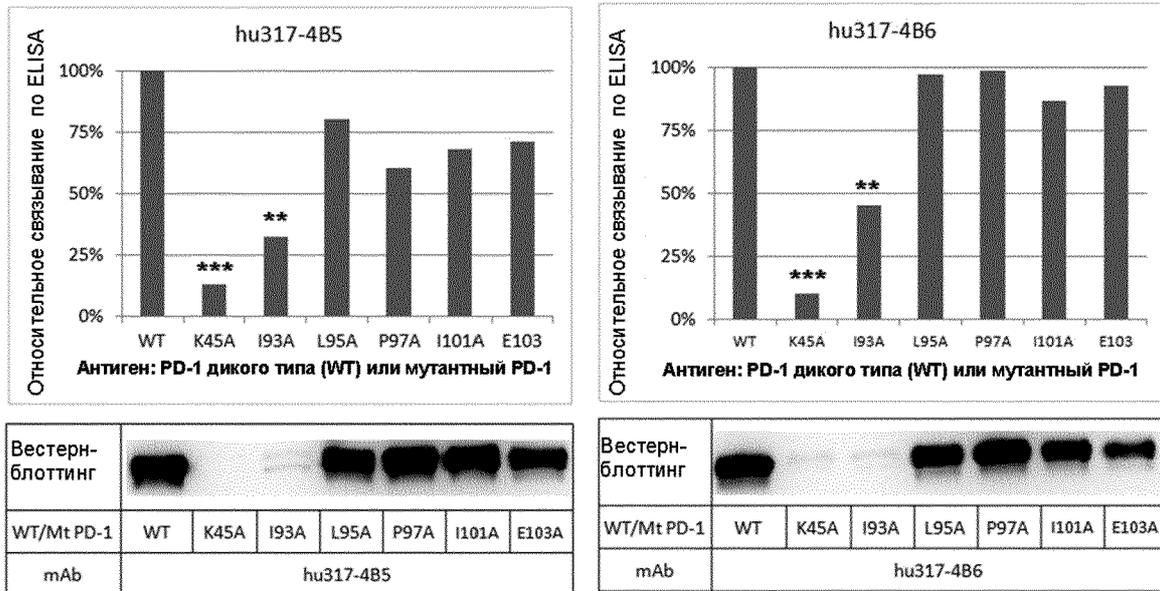
(Б)



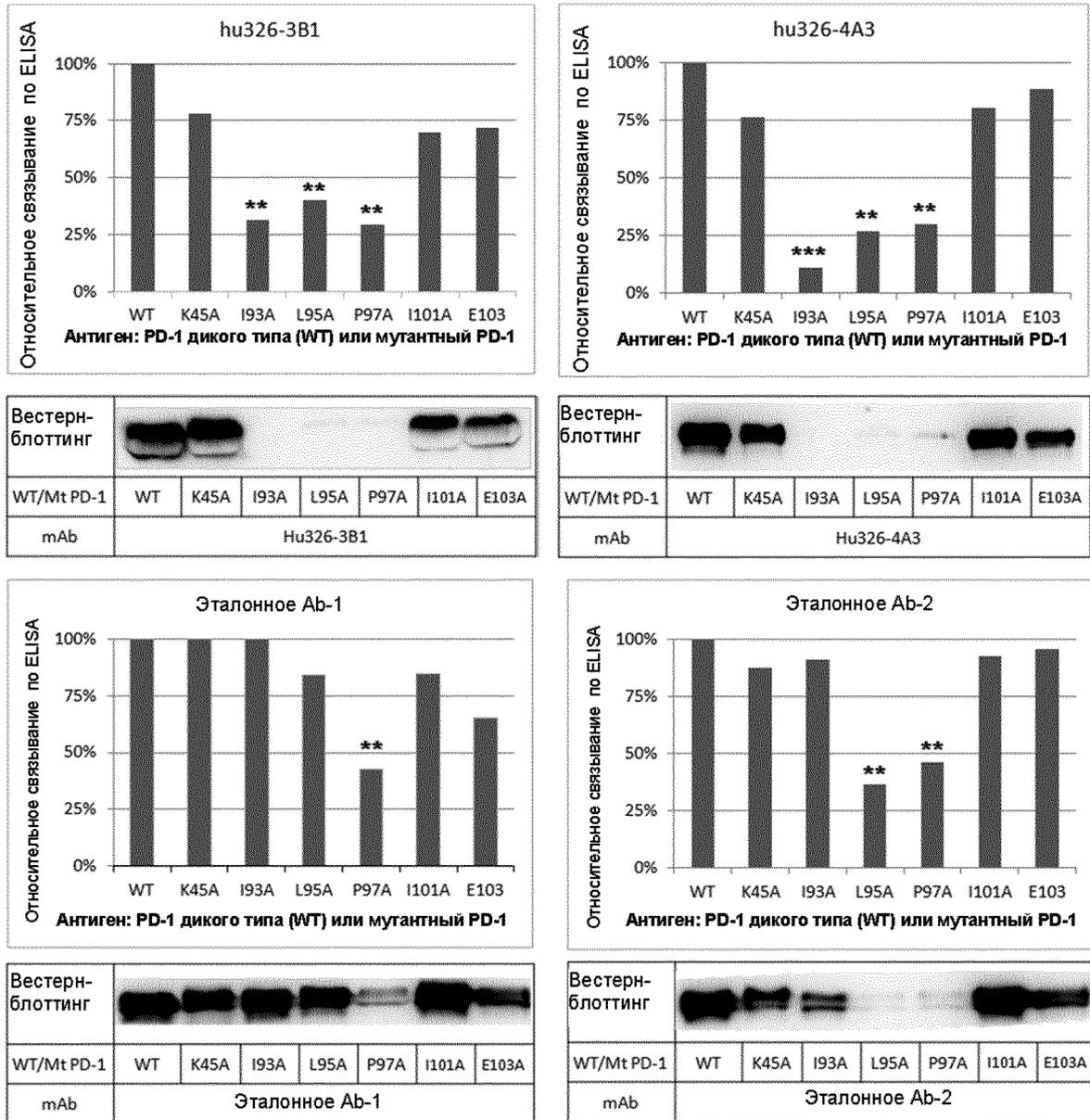
Фиг. 7



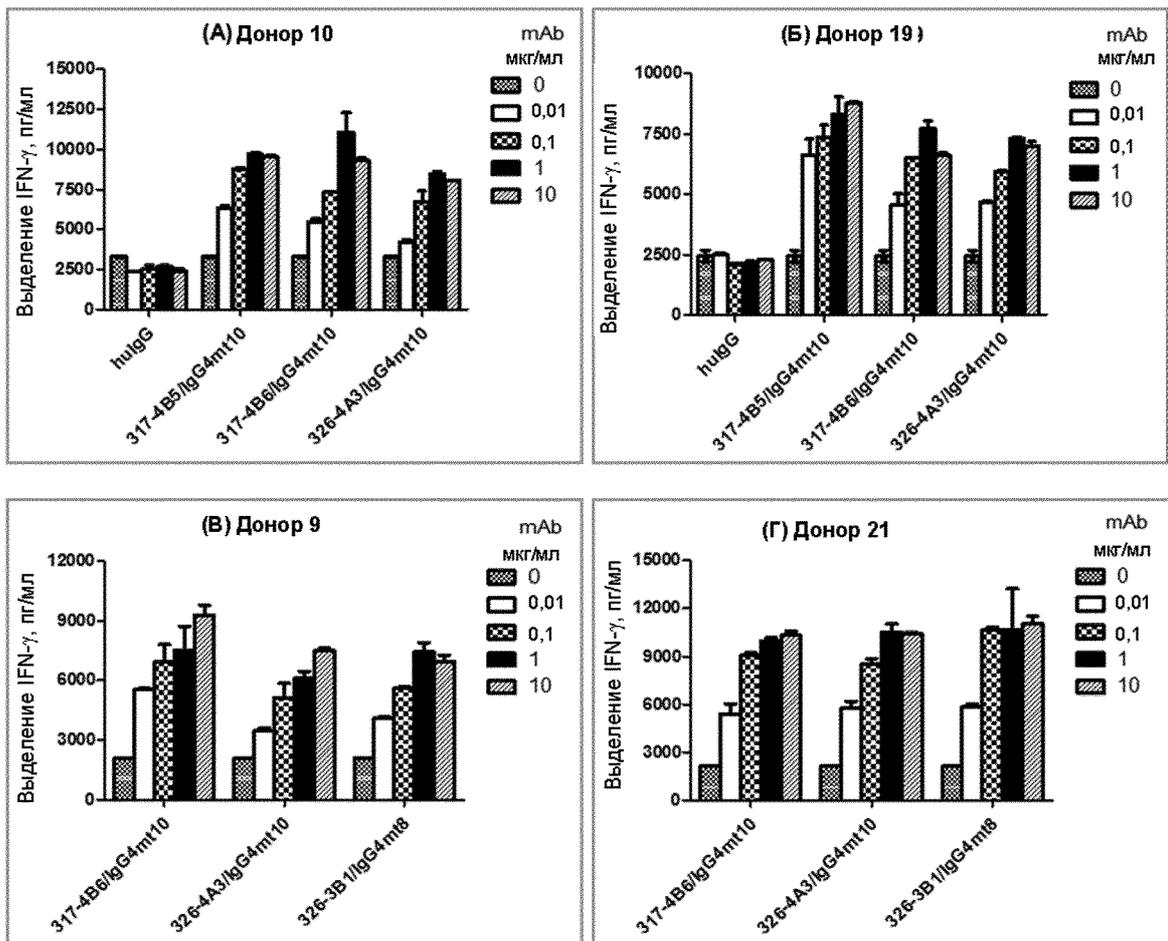
Фиг. 8



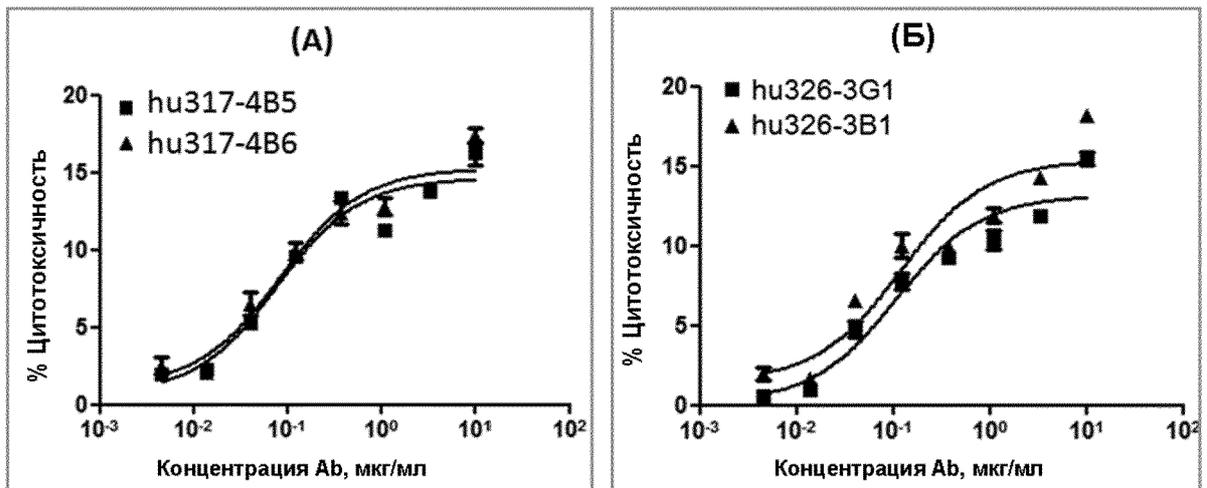
Фиг. 8 (продолжение)



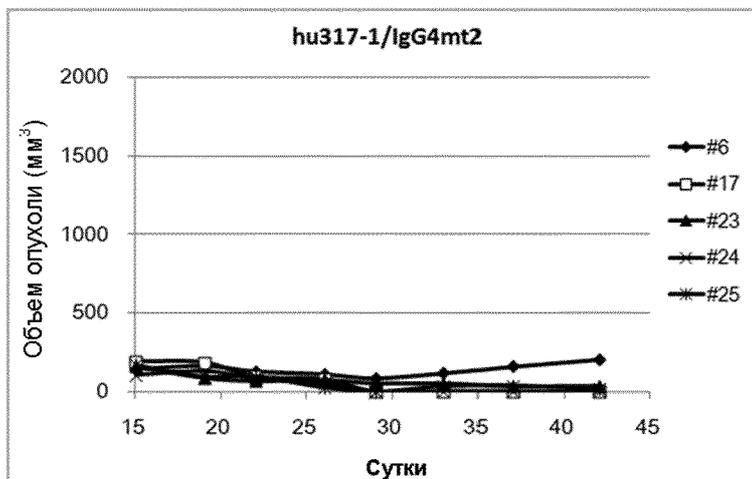
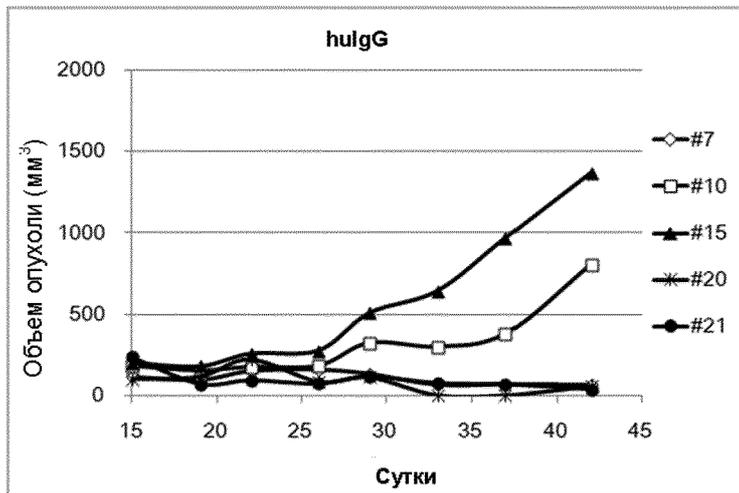
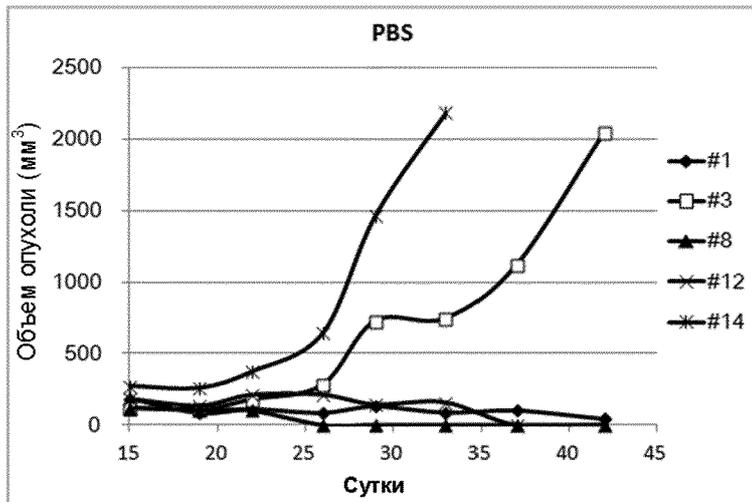
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference BGB-108-PD1	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/CN2013/083467	International filing date (<i>day/month/year</i>) 13 September 2013	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>)
Applicant SONG Jing et al		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

the international application in the language in which it was filed.

a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3. **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,

the text is approved as submitted by the applicant.

the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

the text is approved as submitted by the applicant.

the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____

as suggested by the applicant.

as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. none of the figures is to be published with the abstract.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - on paper
 - in electronic form
 - b. (time)
 - in the international application as filed
 - together with the international application in electronic form
 - subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] The subject matter of claim 15 relates to a method of treatment for diseases, and therefore does not warrant an international search according to the criteria set out in Rule 39.1(iv). However, the search has been carried out and based on the use of the antibody for manufacturing of a medicament.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/083467

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 16-;A61P 35-		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNPAT,WPI,EPODOC,CNKI,PubMed,GOOGLE,NCBI:antibody,binding,specifically,human PD-1,CDR,sequences,CD279,programmed death-1.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BRAHMER, Julie R. et al. "Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer." <i>N Engl J Med.</i> , Vol. Vol.366, No. No.26, 28 June 2012 (2012-06-28), see the whole document	1-17
A	CN 101899114A (WYETH CORP. ET AL.) 01 December 2010 (2010-12-01) see claim 1	1-17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 28 May 2014		Date of mailing of the international search report 16 June 2014
Name and mailing address of the ISA/ STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE P.R.CHINA(ISA/CN) 6,Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer ZHANG,Bin
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No. (86-10)61648321

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2013/083467

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 101899114A	01 December 2010	MX PA05006828A	08 September 2005
		US 2008311117A1	18 December 2008
		AT 514713T	15 July 2011
		IL 169152D0	04 July 2007
		AU 2003288675B2	22 July 2010
		JP 2006521783A	28 September 2006
		US 2010028330A1	04 February 2010
		US 7488802B2	10 February 2009
		AU 2003288675A8	14 July 2004
		US 2004213795A1	28 October 2004
		EP 1576014B1	29 June 2011
		CA 2508660C	20 August 2013
		JP 4511943B2	28 July 2010
		CA 2508660A1	08 July 2004
		BR 0316880A	25 October 2005
		US 7521051B2	21 April 2009
		NO 20053389D0	12 July 2005
		HK 1083510A1	16 December 2011
		IL 169152A	30 November 2010
		NO 20053389A	12 July 2005
		ES 2367430T3	03 November 2011
		US 8088905B2	03 January 2012
		CN 1753912B	02 November 2011
		AU 2003288675A1	14 July 2004
		US 2006210567A1	21 September 2006
		EP 1576014A1	21 September 2005
		WO 2004056875A1	08 July 2004
		CN 1753912A	29 March 2006
		AU 2010235966A1	11 November 2010
		JP 2010189395A	02 September 2010