

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392664 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.14

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.03.31

(54) НОВЫЕ PD-1-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ДОМЕНЫ

(31) 2027892

(32) 2021.03.31

(33) NL

(86) PCT/NL2022/050178

(87) WO 2022/211629 2022.10.06

(71) Заявитель:
МЕРИУС Н.В. (NL); ИНСАЙТ
КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:

Плайт Саймон Эдвард (NL), Майес
Патрик, Настри Орасио Г., Стюарт
Шон М., Бонпан Ребекка А. (US)

(74) Представитель:

Абильманова К.С. (KZ)

(57) Настоящее изобретение относится к новым PD-1-связывающим доменам, которые характеризуются более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем у эталонного PD-1-связывающего домена. PD-1-связывающие домены по настоящему изобретению дополнительно обеспечивают сопоставимую, или равную, или более высокую эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1 человека, чем эталонное антитело к PD-1. Настоящее изобретение дополнительно относится к связывающим молекулам, содержащим такие PD-1-связывающие домены. Также предложен способ лечения заболевания, в частности заболевания, связанного с подавленной иммунной системой, такого как рак, с помощью PD-1-связывающего домена или PD-1-связывающей молекулы по настоящему изобретению. Настоящее изобретение дополнительно относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим переменный участок тяжелой цепи PD-1-связывающих доменов, а также к вектору и клетке, которые содержат такую нуклеиновую кислоту.

A1

202392664

202392664

A1

НОВЫЕ PD-1-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ДОМЕНЫ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области антител. В частности, оно относится к области терапевтических антител для лечения заболеваний, в которых задействованы аберрантные клетки. Более конкретно, оно относится к новым связывающим доменам, которые связываются с PD-1 человека, и к связывающим молекулам, содержащим такой связывающий домен.

Предшествующий уровень техники

Рак по-прежнему является основной причиной смерти в мире, несмотря на многочисленные достижения, которые были сделаны в лечении данного заболевания, и расширение знаний о молекулярных явлениях, которые приводят к развитию рака. Традиционно большинство открытий противораковых лекарственных средств были сосредоточены на средствах, которые блокируют основные функции клеток и уничтожают делящиеся клетки. Однако в случаях рака на поздних стадиях, независимо от того, насколько агрессивно оно применяется, даже до такой степени, когда пациенты страдают от опасных для жизни побочных эффектов лечения, химиотерапия редко приводит к полному излечению. В большинстве случаев опухоли у пациентов перестают расти или временно уменьшаются (что называют ремиссией) только для того, чтобы снова начать пролиферировать, иногда быстрее (что называют рецидивом), и их становится все труднее лечить. За последние годы центр внимания разработки противораковых лекарственных средств сместился от широко цитотоксической химиотерапии к средствам таргетной цитостатической терапии с меньшей токсичностью. Лечение рака на поздних стадиях с помощью средств таргетной терапии было признано обоснованным в клинических условиях при лейкозе и некоторых других формах рака. Однако в большинстве случаев различных форм

саркомы таргетные подходы по-прежнему оказываются недостаточно эффективными для полной ликвидации рака у большинства пациентов.

Целенаправленное воздействие на различные формы рака было достигнуто с помощью ряда различных способов, в том числе, например, малых молекул, направленных на сигнальные белки, от которых зависит выживание и/или рост рака, вакцин с опухолеспецифическими белками, средств клеточной терапии с иммунными клетками, которые активно уничтожают опухолевые клетки, и антител, которые нацеливают цитотоксические молекулы на опухоль, препятствуют передаче сигналов и/или (пере)направляют иммунную систему хозяина на опухолевые клетки.

Интересной мишенью для терапии антителами являются белки иммунных контрольных точек, такие как, например, PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3 и TIM-3. На сегодняшний день описан ряд моноспецифических антител, нацеленный на PD-1, а также некоторые биспецифические антитела, содержащие связывающий домен, нацеленный на PD-1. Однако у каждого из данных антител есть свои проблемы при производстве эффективного терапевтического лекарственного средства. Таким образом, остается потребность в разработке новых PD-1-связывающих доменов для получения эффективных терапевтических антител, целенаправленно воздействующих на PD-1.

Сущность изобретения

Одной из целей настоящего изобретения является создание нового фармацевтического средства для лечения заболевания человека, в частности, для лечения рака. Данная цель достигается путем создания новых связывающих доменов антитела к PD-1 человека и, в частности, связывающих молекул, таких как антитела, содержащие такие связывающие домены антитела к PD-1 человека.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложен связывающий домен антитела к PD-1 человека, характеризующийся более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонный

связывающий домен антитела к PD-1 человека, где эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека содержит вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, и вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 21.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложен связывающий домен антитела к PD-1 человека, который при наличии в моновалентной форме в бивалентном антителе обеспечивает по меньшей мере сопоставимую, или равную, или более высокую эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1, чем эталонное антитело к PD-1 человека, где эталонное антитело к PD-1 человека содержит два вариабельных участка тяжелой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, и два вариабельных участка легкой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 21.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложена связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, и, в частности, моноспецифическая или мультиспецифическая связывающая молекула, такая как моноспецифическое или мультиспецифическое антитело, содержащее такой PD-1-связывающий домен.

В определенной варианте осуществления настоящим изобретением предложена фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество связывающего домена антитела к PD-1 человека или связывающей молекулы, которые описаны в данном документе.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложен PD-1-связывающий домен, связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен, и фармацевтическая композиция, которые описаны в данном документе, для применения (a) в терапии или (b) при лечении

заболевания, связанного с подавленной иммунной системой, или с) при лечении рака.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложен способ лечения заболевания, предусматривающий введение эффективного количества PD-1-связывающего домена, связывающей молекулы, содержащей PD-1-связывающий домен, или фармацевтической композиции, которые описаны в данном документе, нуждающемуся в этом индивидууму.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложен способ лечения рака, предусматривающий введение эффективного количества PD-1-связывающего домена, связывающей молекулы, содержащей PD-1-связывающий домен, или фармацевтической композиции, которые описаны в данном документе, нуждающемуся в этом индивидууму.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложены последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая переменный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к PD-1 человека, который описан в данном документе, вектор или клетка, которые содержат такую последовательность нуклеиновой кислоты, и клетка, продуцирующая связывающий домен антитела к PD-1 человека или связывающую молекулу, которые описаны в данном документе.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложен способ получения связывающего домена антитела к PD-1 человека, который описан в данном документе, а также способ получения его вариантов.

Подробное описание

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложены несколько связывающих доменов антитела к PD-1 человека, переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1-9. В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к PD-1 человека

содержит переменный участок тяжелой цепи, где переменный участок тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) любого из переменных участков тяжелой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1-9.

Белок запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1) представляет собой рецептор на клеточной поверхности, который принадлежит к семейству рецепторов CD28 и экспрессируется на Т-клетках и про-В-клетках. В настоящее время известно, что PD-1 связывает два лиганда: PD-L1 и PD-L2. PD-1, который выполняет функцию иммунной контрольной точки, играет важную роль в даунрегуляции иммунной системы путем ингибирования активации Т-клеток, что, в свою очередь, уменьшает аутоиммунитет и способствует ауто толерантности. Считается, что ингибирующий эффект PD-1 достигается за счет двойного механизма стимулирования апоптоза (запрограммированной клеточной гибели) в антигенспецифичных Т-клетках в лимфатических узлах при одновременном уменьшении апоптоза в регуляторных Т-клетках (супрессорных Т-клетках). PD-1 также известен под различными альтернативными названиями, такими как PDCD1, рецептор запрограммированной клеточной гибели 1, фактор восприимчивости к системной красной волчанке 2, белок PD-1, HPD-1, PD1, белок запрограммированной клеточной гибели 1, антиген CD279, CD279, HPD-L, HSLE1, SLEB2 и PD-1. Внешние идентификаторы для PD-1: HGNC: 8760; Entrez Gene: 5133; Ensembl: ENSG00000188389; OMIM: 600244 и UniProtKB: Q15116. Новые классы лекарственных средств, которые блокируют активность PD-1, т.е. ингибиторы PD-1, активируют иммунную систему, заставляя ее атаковать опухоли, и по этой причине их с определенным успехом применяют для лечения некоторых типов рака.

В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к PD-1 человека содержит по меньшей мере переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи. Переменный участок легкой цепи может представлять собой любой подходящий переменный участок легкой цепи,

описанный далее в данном документе. В определенных вариантах осуществления переменный участок легкой цепи предпочтительно представляет собой переменный участок легкой цепи из легкой цепи, которая способна образовывать пары с множеством тяжелых цепей, характеризующихся специфичностью к различным эпитопам. Такая легкая цепь в данной области техники также называется «общей легкой цепью». В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложен связывающий домен антитела к PD-1 человека, характеризующийся более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека, где эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека содержит переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, и переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 21.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложена бивалентная моноспецифическая связывающая молекула, содержащая связывающие домены антитела к PD-1 человека, где связывающая молекула характеризуется более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонное антитело к PD-1 человека, где эталонное антитело к PD-1 человека содержит два переменных участка тяжелой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, и два переменных участка легкой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 21, такое как моноспецифическое антитело к PD-1 ниволумаб или моноспецифическое антитело к PD-1, содержащее переменные участки ниволумаба.

Определение того, характеризуется ли связывающий домен антитела к PD-1 человека более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека, можно осуществить путем измерения аффинности связывания обоих связывающих доменов антитела к PD-1 человека в анализе одного типа, используя одинаковые условия анализа.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления аффинность связывания связывающего домена антитела к PD-1 человека или бивалентной моноспецифической связывающей молекулы и аффинность связывания эталонного связывающего домена антитела к PD-1 человека или эталонного антитела к PD-1 человека измерены в анализе одного типа, используя одинаковые условия анализа. В определенных вариантах осуществления анализ представляет собой анализ, в котором применяют поверхностный плазмонный резонанс (SPR) для измерения аффинности связывания, такой как биосенсорная система Biacore®, или равновесное титрование раствора (SET) (см. Friguet B et al. (1985) *J. Immunol Methods*; 77(2): 305-319, и Hanel C et al. (2005) *Anal Biochem*; 339(1): 182-184). Значения аффинности связывания PD-1-связывающих доменов или бивалентных моноспецифических связывающих молекул, представленных в данном документе, получены с помощью способа, описанного в примере 3. Вкратце: в примере 3 описано проведение SPR с применением прибора Biacore 8K при температуре 25°C. Антитела к Fc человека иммобилизуют посредством аминного связывания на проточных ячейках сенсорного чипа CM5 Series S с уровнями иммобилизации ~9000 RU. Требуемого уровня захвата (100-150 RU) антител к PD-1 достигают путем пропускания заданной концентрации антител к PD-1 через активную проточную ячейку каждого канала в течение 60 секунд со скоростью потока 10 мкл/мин. В течение 240 секунд (время ассоциации) вводят серию концентраций трехкратного серийного разведения PD-1 (всего 7 концентраций, наиболее высокая на уровне 300 нМ) и рабочего буфера, сразу после этого вводят рабочий буфер в течение 480 секунд (время диссоциации) при скорости потока 45 мкл/мин. Поверхность регенерируют 30-секундным введением 3 М MgCl₂ со скоростью потока 30 мкл/мин. Кинетику связывания и параметры аффинности получают путем глобальной аппроксимации данных к модели связывания 1:1.

Предпочтительно, SPR проводят со связывающими доменами антитела к PD-1 человека в формате IgG, измеряя аффинность связывания моновалентного взаимодействия с PD-1.

В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к PD-1 человека или бивалентная моноспецифическая связывающая молекула характеризуется по меньшей мере в десять раз более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека или эталонное антитело к PD-1 человека, по результатам измерения методом SPR, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к PD-1 человека или бивалентная моноспецифическая связывающая молекула характеризуется в десять - пятьдесят, в десять - сорок, в десять - тридцать или в десять - двадцать раз более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека или эталонное антитело к PD-1 человека, по результатам измерения методом SPR, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к PD-1 человека или бивалентная моноспецифическая связывающая молекула характеризуется в десять раз более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека или эталонное антитело к PD-1 человека, по результатам измерения методом SPR, как описано в данном документе.

В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к PD-1 человека или бивалентная моноспецифическая связывающая молекула характеризуются аффинностью связывания с PD-1 человека в диапазоне приблизительно 0,1-1,0 нМ, в частности в диапазоне приблизительно 0,3-0,8 нМ, более конкретно в диапазоне приблизительно 0,38-0,78 нМ по результатам измерения методом SPR, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к PD-1 человека или бивалентная моноспецифическая связывающая молекула характеризуются аффинностью связывания с PD-1 человека в диапазоне 0,1-1,0 нМ, в частности в диапазоне 0,3-0,8 нМ, более конкретно в диапазоне 0,38-0,78 нМ по результатам измерения методом SPR, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления аффинность связывания представляет собой аффинность связывания моновалентного взаимодействия с PD-1.

В определенных вариантах осуществления аффинность связывания измерена как со связывающим доменом антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, так и с эталонным связывающим доменом антитела к PD-1 человека в бивалентном моноспецифическом формате IgG. В определенных вариантах осуществления аффинность связывания измерена как с использованием связывающего домена антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, так и с использованием эталонного связывающего домена антитела к PD-1 человека в бивалентном биспецифическом формате IgG. В определенных вариантах осуществления аффинность связывания измерена с использованием связывающего домена антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению в бивалентном биспецифическом формате IgG и с использованием эталонного связывающего домена антитела к PD-1 человека в бивалентном моноспецифическом формате IgG. Бивалентный биспецифический формат IgG может, например, содержать PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению или эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека, а также связывающий домен, который связывает произвольно выбранную неродственную мишень.

Настоящим изобретением также предложен связывающий домен антитела к PD-1 человека, который при наличии в моновалентной форме в бивалентном антителе обеспечивает по меньшей мере сопоставимую, или равную, или более высокую эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1, чем эталонное антитело к PD-1 человека, где эталонное антитело к PD-1 человека содержит два переменных участка тяжелой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, и два переменных участка легкой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 21.

Настоящим изобретением также предложена бивалентная моноспецифическая связывающая молекула антитела к PD-1 человека, которая характеризуется по меньшей мере сопоставимой, или равной, или более высокой эффективностью блокирования связывания лиганда с PD-1, чем эталонное антитело к PD-1

человека, где эталонное антитело к PD-1 человека содержит два переменных участка тяжелой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, и два переменных участка легкой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 21.

Определение того, обеспечивает ли связывающий домен антитела к PD-1 человека или бивалентная моноспецифическая связывающая молекула антитела к PD-1 человека сопоставимую, или равную, или более высокую эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1, чем эталонное антитело к PD-1 человека, можно осуществить путем измерения эффективности как связывающего домена антитела к PD-1 человека или молекулы антитела к PD-1 человека, так и эталонного антитела к PD-1 человека в анализе одного типа, используя одинаковые условия анализа. Таким образом, в определенных вариантах осуществления эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1 у связывающего домена антитела к PD-1 человека или у бивалентной моноспецифической связывающей молекулы и эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1 у эталонного антитела к PD-1 человека измерены в анализе одного типа, используя одинаковые условия анализа. В определенных вариантах осуществления анализ представляет собой анализ PD-1/PD-L1 по гену-репортеру. Данные об эффективности PD-1-связывающих доменов или связывающих молекул, содержащих PD-1-связывающие домены, представленные в данном документе, получены с помощью анализа PD-1/PD-L1 по гену-репортеру, как описано в примере 2.

Вкратце: анализ PD-1/PD-L1 по гену-репортеру, описанный в примере 2, проводят с применением клеток aAPC/CHO-K1 с PD-L1, которые представляют собой клетки CHO-K1, экспрессирующие PD-L1 человека и сконструированный белок на клеточной поверхности, предназначенный для активации родственных TCR антиген-независимым образом, и Т-клеток Jurkat, экспрессирующих PD-1 человека и ген-репортер люциферазы, управляемый элементом, чувствительным к NFAT (NFAT-RE). Аналитические планшеты, содержащие клетки с PD-L1 или

PBS, инкубируют в течение ночи при температуре 37°C, в условиях 5% CO₂ и 95% относительной влажности. После инкубации лунки опорожняют и вносят тестируемый и контрольный IgG в серийном разведении, начиная с 10 мкг/мл и проводя 6-стадийное 4-кратное титрование. Также готовят основной контроль, то есть контроль без IgG. IgG, активность которых необходимо непосредственно сравнить, инкубируют на одной планшете. Добавляют Т-клетки Jurkat и аналитические планшеты инкубируют в течение 6 часов при температуре 37°C, в условиях 5% CO₂ и 95% относительной влажности. После 6 часов инкубации планшеты оставляют при комнатной температуре на 10 мин и измеряют люциферазную активность.

Предпочтительно, связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению и эталонное антитело к PD-1 человека применяют в одной и той же концентрации, предпочтительно оба в бивалентном моноспецифическом формате IgG.

В определенных вариантах осуществления сопоставимая эффективность активности блокирования связывания лиганда – PD-1 представляет собой эффективность в 5-кратном диапазоне эффективности блокирования связывания лиганда с PD-1 эталонного связывающего домена антитела к PD-1 человека или эталонной связывающей молекулы антитела к PD-1 человека и включает 5, 4, 3 и 2-кратное, предпочтительно 3-кратное отклонение от эффективности блокирования связывания лиганда с PD-1 эталонного антитела к PD-1 человека.

В определенных вариантах осуществления более высокая эффективность активности блокирования связывания лиганда – PD-1 представляет собой эффективность, которая в 5, 4, 3 или 2 раза, предпочтительно в 3 раза выше, чем эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1 эталонного антитела к PD-1 человека. В определенных вариантах осуществления более высокая эффективность активности блокирования связывания лиганда – PD-1 представляет собой эффективность, которая в 1,1-2,0 раза, предпочтительно в 1,2-1,8 или 1,2-1,6 раза, более предпочтительно в 1,2-1,4 раза выше, чем

эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1 эталонного антитела к PD-1 человека.

Эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека представляет собой PD-1-связывающий домен антитела-аналога ниволумаба, предпочтительно полученный с применением того же способа получения, что и для подлежащего сравнению связывающего домена антитела к PD-1 человека. Эталонное антитело к PD-1 человека представляет собой антитело-аналог ниволумаба, предпочтительно полученное с применением того же способа получения, что и для бивалентной моноспецифической связывающей молекулы, содержащей подлежащий сравнению связывающий домен антитела к PD-1 человека. Антитело-аналог ниволумаба характеризуется той же последовательностью переменного участка тяжелой цепи (SEQ ID NO: 20), что и ниволумаб. Антитело-аналог ниволумаба характеризуется той же последовательностью переменного участка легкой цепи (SEQ ID NO: 21), что и ниволумаб.

В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к PD-1 человека содержит переменный участок тяжелой цепи, где переменный участок тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) одного из переменных участков тяжелой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1-9.

Последовательности CDR можно определить с использованием различных способов, в том числе без ограничения схемы нумерации по Kabat (Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); и/или Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991)), схемы нумерации по Chothia (Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342: 877-883, 1989; и/или Al-Lazikani B. et al., J. Mol. Biol., 273: 927-948 (1997)), системы нумерации по Honegger и Plückthun (Honegger and Plückthun, J. Mol. Biol., 309:657-670 (2001)), системы нумерации по MacCallum (MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996); и/или Abhinandan and Martin, Mol.

Immunol., 45: 3832-3839 (2008)), системы нумерации по Lefranc (Lefranc M.P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27: 55-77 (2003); и/или Honegger and Plückthun, J. Mol. Biol., 309:657-670 (2001)) или согласно IMGT (рассмотрено в Giudicelli et al., Nucleic Acids Res. 25: 206-211 (1997)).

Каждая из данных схем нумерации устанавливает свое определение CDR на прогнозируемом вкладе аминокислотных остатков в вариабельном участке тяжелой или легкой цепи в связывание антигена. Следовательно, для идентификации CDR связывающих доменов по настоящему изобретению можно применять любой из перечисленных способов идентификации CDR. В определенных вариантах осуществления CDR тяжелой цепи связывающего домена по настоящему изобретению соответствуют схеме Kabat, Chothia или IMGT. В определенных вариантах осуществления CDR тяжелой цепи связывающего домена по настоящему изобретению соответствуют схеме Kabat. В определенных вариантах осуществления CDR тяжелой цепи связывающего домена по настоящему изобретению соответствуют схеме Chothia. В определенных вариантах осуществления CDR тяжелой цепи связывающего домена по настоящему изобретению соответствуют схеме IMGT.

В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к PD-1 человека содержит вариабельный участок тяжелой цепи, где вариабельный участок тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) из вариабельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO:1-9, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) из вариабельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO:1-9, и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) из вариабельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 1-9.

HCDR по Kabat выделены жирным шрифтом и подчеркнуты в перечне последовательностей, представленном в данном документе.

В определенных вариантах осуществления вариабельный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к PD-1 человека содержит следующее:

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 33 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью,

которая изложена под SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 45 соответственно; или

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48 соответственно;

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены.

В определенных вариантах осуществления вариабельный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к PD-1 человека содержит следующее:

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 33 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 45 соответственно; или

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48 соответственно.

В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению также охватывает варианты PD-1-связывающего домена, где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены. В определенных вариантах осуществления лишь один или два HCDR могут содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены.

Например, подходящие положения для введения модификации аминокислоты включают без ограничения первую, вторую и/или четвертую аминокислоту HCDR1, третью, седьмую, восьмую, девятую, десятую, одиннадцатую, тринадцатую, четырнадцатую и/или шестнадцатую аминокислоту HCDR2 и/или шестую и/или тринадцатую аминокислоту HCDR3. Последовательности CDR согласно Kabat выделены жирным шрифтом и подчеркнуты в перечне последовательностей, представленном в данном документе.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении также предложен связывающий домен антитела к PD-1 человека, содержащий следующее:

- HCDR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью $X_1X_2FX_3S$, где

X_1 может представлять собой F, Y, T или H;

X_2 может представлять собой Y, Q, E, H или D;

X_3 может представлять собой W или Y; и/или

- HCDR2, характеризующийся аминокислотной последовательностью $YIX_1YSGX_2X_3X_4X_5X_6PX_7X_8KX_9$, где

X_1 может представлять собой Y, V или I;

X_2 может представлять собой S или G;

X_3 может представлять собой T, Y, S, H, N, W, L или Q;

X₄ может представлять собой S или N;

X₅ может представлять собой F, V или L;

X₆ может представлять собой N или S;

X₇ может представлять собой S или A;

X₈ может представлять собой F или L;

X₉ может представлять собой S, T, G, D, R или N; и/или

- HCDR3, характеризующийся аминокислотной последовательностью GGYTGX₁GGDWFDX₂, где

X₁ может представлять собой Y, H, V или A;

X₂ может представлять собой P, V, Y, W, F, T, Q, H или S.

Другие подходящие положения для введения модификации аминокислоты включают без ограничения вторую, третью, четвертую и/или пятую аминокислоту HCDR1, третью, четвертую, пятую, шестую, восьмую, девятую, десятую, одиннадцатую, двенадцатую, тринадцатую, четырнадцатую, пятнадцатую, шестнадцатую и/или семнадцатую аминокислоту HCDR2 и/или первую, вторую, шестую, седьмую, девятую, десятую, четырнадцатую, пятнадцатую, шестнадцатую и/или восемнадцатую аминокислоту HCDR3. Последовательности CDR согласно Kabat выделены жирным шрифтом и подчеркнуты в перечне последовательностей, представленном в данном документе.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении также предложен связывающий домен антитела к PD-1 человека, содержащий следующее:

- HCDR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью RX₁X₂X₃X₄, где

X₁ может представлять собой F или Y;

X₂ может представлять собой T, A или V;

X₃ может представлять собой M, L или V;

X₄ может представлять собой S, H, N, V или T; и/или

- HCDR2, характеризующийся аминокислотной последовательностью WIX₁X₂X₃X₄GX₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄, где

X₁ может представлять собой N или D;

X₂ может представлять собой P, S или T;

X₃ может представлять собой N или Q;

X₄ может представлять собой T или D;

X₅ может представлять собой N, S, T, K, L или E;

X₆ может представлять собой P, Y, A, H или F;

X₇ может представлять собой T или S;

X₈ может представлять собой Y, F или H;

X₉ может представлять собой A, G, V или F;

X₁₀ может представлять собой Q, R, N, L, T или S;

X₁₁ может представлять собой D, A, G или S;

X₁₂ может представлять собой F, V или A;

X₁₃ может представлять собой T, K, H, G;

X₁₄ может представлять собой G, N, E или D; и/или

- HCDR3, характеризующийся аминокислотной последовательностью $X_1X_2GYCX_3X_4DX_5CYPNX_6X_7X_8DX_9$, где

X_1 может представлять собой I, S или V;

X_2 может представлять собой L, Q или N;

X_3 может представлять собой N, G, S или D;

X_4 может представлять собой T, S, P, N или E;

X_5 может представлять собой N или I;

X_6 может представлять собой W, G, Q, H, W, A или L;

X_7 может представлять собой I, V или L;

X_8 может представлять собой F, L или I;

X_9 может представлять собой Y, S, N, I, R, H, V, T, K, A или L.

В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению содержит вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 1-9, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению также охватывает варианты PD-1-связывающего домена, которые, в дополнение к упомянутым выше модификациям в HCDR, содержат одну или несколько модификаций каркасных участков. В определенных вариантах осуществления вариант PD-1-связывающего домена по настоящему изобретению не содержит модификаций в CDR-участках, но содержит одну или несколько модификаций в каркасных участках. Такие варианты характеризуются по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более

предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с последовательностями, раскрытыми в данном документе, и, согласно ожиданиям, они сохраняют специфичность связывания PD-1. Таким образом, в определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению содержит следующее:

- вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, при этом вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 25, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 26, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 27;

- вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 2, при этом вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 28, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 29, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 30;

- вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 3, при этом вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 31,

аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 32, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 33;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 4, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 34, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 36;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 5, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 37, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 38, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 39;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 40, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID

NO: 41, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 42;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 7, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 43, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 44, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 45;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 8, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 46, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 47, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 48; или

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 9, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 22, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 23, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 24.

В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению содержит вариабельный участок легкой цепи. Примером подходящего вариабельного участка легкой цепи является вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51 соответственно, где каждый из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены. В определенных вариантах осуществления подходящий вариабельный участок легкой цепи представляет собой вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51 соответственно. В определенных вариантах осуществления такой вариабельный участок легкой цепи может содержать вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 16, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним. Легкая цепь или вариабельный участок легкой цепи, включающие данные LCDR и/или вариабельный участок легкой цепи, представляет собой легкую цепь, называемую в данной области техники VK1-39/JK1. Это общая легкая цепь.

В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению содержит вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 16, при этом вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность LCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 49, аминокислотную последовательность LCDR2, которая изложена под SEQ ID

NO: 50, и аминокислотную последовательность LCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 51.

Термин «общая легкая цепь» согласно настоящему изобретению относится к легкой цепи, которая способна образовывать пары с множеством различных тяжелых цепей, т. е. тяжелыми цепями, характеризующимися различными специфичностями связывания антигена или эпитопа. Общая легкая цепь особенно полезна при создании, например, биспецифических антител, при этом получение антител более эффективно, когда оба связывающих домена содержат одинаковую легкую цепь. Термин «общая легкая цепь» охватывает легкие цепи, которые идентичны или имеют некоторые различия в аминокислотных последовательностях, при этом не затрагивается специфичность связывания полноразмерного антитела. Например, в рамках объема определения общих легких цепей, используемого в данном определении, можно получить или найти легкие цепи, которые не идентичны, но все же функционально эквивалентны, например, при введении и тестировании консервативных аминокислотных изменений, изменений аминокислот в участках, которые не вносят вклад или вносят лишь частичный вклад в специфичность связывания при образовании пары с тяжелой цепью, и т. п.

Помимо общей легкой цепи, содержащей упомянутые выше LCDR и/или переменный участок легкой цепи, можно применять и другие общие легкие цепи, известные в данной области техники. Примеры таких общих легких цепей включают без ограничения следующее: VK1-39/JK5, содержащий переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 52. LCDR согласно IMGT выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной

последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 52, где каждый из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 52, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним, VK3-15/JK1, содержащий переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) переменного участка легкой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 53. LCDR согласно IMGT выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 53, где каждый из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 53, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним, VK3-20/JK1, содержащий переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) переменного участка легкой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 54. LCDR согласно IMGT выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), переменный

участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 54, где каждый из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 54, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним, и VL3-21/JL3, содержащий переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) переменного участка легкой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 55. LCDR согласно IMGT выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 55, где каждый из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 55, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

VK1-39 является сокращением от гена переменного домена цепи каппа 1-39. Ген также известен как ген переменного домена цепи каппа 1-39 иммуноглобулина, IGKV139, IGKV1-39, IgVκ1-39. Внешними идентификаторами гена являются HGNC: 5740; Entrez Gene: 28930; Ensembl: ENSG00000242371. Предпочтительная аминокислотная последовательность VK1-39 изложена под SEQ ID NO: 56. Это последовательность V-участка. V-

участок можно комбинировать с одним из пяти J-участков. Две предпочтительные соединенные последовательности обозначены как VK1-39/JK1 и VK1-39/JK5, альтернативные названия: IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 или IgVκ1-39*01/IGJκ5*01 (номенклатура согласно доступной во всемирной сети базе данных IMGT на imgt.org). Данные названия являются иллюстративными и охватывают аллельные варианты сегментов гена.

VK3-15 является сокращением от гена варибельного домена цепи каппа 3-15. Ген также известен как ген варибельного домена цепи каппа 3-15 иммуноглобулина, IGKV315, IGKV3-15, IgVκ3-15. Внешними идентификаторами гена являются HGNC: 5816; Entrez Gene: 28913; Ensembl: ENSG00000244437. Предпочтительная аминокислотная последовательность VK3-15 изложена под SEQ ID NO: 57. Это последовательность V-участка. V-участок можно комбинировать с одним из пяти J-участков. Предпочтительная соединенная последовательность обозначена как VK3-15/JK1, альтернативным названием является Vκ3-15*01/IGJκ1*01 (номенклатура согласно доступной во всемирной сети базе данных IMGT на imgt.org). Данное название является иллюстративным и охватывает аллельные варианты сегментов гена.

VK3-20 является сокращением от гена варибельного домена цепи каппа 3-20. Ген также известен как ген варибельного домена цепи каппа 3-20 иммуноглобулина, IGKV320, IGKV3-20, IgVκ3-20. Внешними идентификаторами гена являются HGNC: 5817; Entrez Gene: 28912; Ensembl: ENSG00000239951. Предпочтительная аминокислотная последовательность VK3-20 представлена под SEQ ID NO: 58. Это последовательность V-участка. V-участок можно комбинировать с одним из пяти J-участков. Предпочтительная соединенная последовательность обозначена как VK3-20/JK1, альтернативным названием является IgVκ3-20*01/IGJκ1*01 (номенклатура согласно доступной во всемирной сети базе данных IMGT на imgt.org). Данное название является иллюстративным и охватывает аллельные варианты сегментов гена.

VL3-21 является сокращением от гена варибельного домена цепи лямбда 3-21. Ген также известен как ген варибельного домена цепи лямбда 3-21 иммуноглобулина, IGLV321, IGLV3-21, IgV λ 3-21. Внешними идентификаторами гена являются HGNC: 5905; Entrez Gene: 28796; Ensembl: ENSG00000211662.2. Предпочтительная аминокислотная последовательность VL3-21 изложена под SEQ ID NO: 59. Это последовательность V-участка. V-участок можно комбинировать с одним из пяти J-участков. Предпочтительная соединенная последовательность обозначена как VL3-21/JL3, альтернативным названием является IgV λ 3-21/IGJ λ 3 (номенклатура согласно доступной во всемирной сети базе данных IMGT на imgt.org). Данное название является иллюстративным и охватывает аллельные варианты сегментов гена.

Дополнительно можно применять любой варибельный участок легкой цепи антитела к PD-1, доступного в данной области техники, или любой другой варибельный участок легкой цепи, который можно легко получить, такой как, например, из библиотеки дисплея антител, по проявлению антигенсвязывающей активности в паре с PD-1-связывающим доменом по настоящему изобретению.

В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению может дополнительно содержать участок CH1 и CL. Можно применять любой домен CH1, в частности домен CH1 человека. Примером подходящего домена CH1 является аминокислотная последовательность, представленная под SEQ ID NO: 17. Можно применять любой домен CL, в частности CL человека. Примером подходящего домена CL является аминокислотная последовательность, представленная под SEQ ID NO: 60.

PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению можно применять в качестве связывающего домена в связывающей молекуле. «Связывающая молекула» относится к белковой молекуле и включает, например, все форматы антител, доступные в данной области техники, такие как, например, полноразмерное антитело IgG, иммуноконъюгаты, диатела, BiTE, молекулы Fab,

scFv, tandemные scFv, однодоменное антитело (такое как V_{HH} и V_H), минитела, scFab, scFv-зиппер, нанотела, молекулы DART, tandemное антитело (TandAb), Fab-scFv, $F(ab)'_2$, $F(ab)'_2$ -scFv2 и интрате́ла.

В одном варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой моноспецифическую связывающую молекулу, в частности моноспецифическое антитело. Моноспецифическое антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело, в любом формате антитела, которое содержит один или несколько связывающих доменов со специфичностью к одной мишени. В определенных вариантах осуществления моноспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению может дополнительно содержать Fc-участок или его часть. В определенных вариантах осуществления моноспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой антитело IgG1.

В одном варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой мультиспецифическую связывающую молекулу, в частности мультиспецифическое антитело. Мультиспецифическое антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело в любом формате антитела, которое содержит по меньшей мере два связывающих домена, которые характеризуются специфичностью по меньшей мере к двум различным мишеням или эпитопам. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению представляет собой биспецифическое антитело. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению может дополнительно содержать Fc-участок или его часть. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело IgG1.

Настоящим изобретением дополнительно предложена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая переменный участок тяжелой цепи

связывающего домена или связывающей молекулы антитела к PD-1 человека, которые описаны в данном документе.

Дополнительно в данном документе предложен вектор, пригодный для получения PD-1-связывающего домена или PD-1-связывающей молекулы по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления такой вектор экспрессии содержит полинуклеотид, кодирующий переменный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к PD-1 человека, который описан в данном документе. В определенных вариантах осуществления вектор по настоящему изобретению может дополнительно кодировать участок CH1 и предпочтительно шарнирный участок, участок CH2 и CH3. В определенных вариантах осуществления вектор по настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий переменный участок легкой цепи и предпочтительно участок CL. В определенных вариантах осуществления переменный участок легкой цепи может представлять собой переменный участок общей легкой цепи, как описано в данном документе.

Настоящим изобретением также предложена клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к PD-1 человека, который описан в данном документе. В определенных вариантах осуществления клетка по настоящему изобретению может дополнительно содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую участок CH1 и предпочтительно шарнирный участок, участок CH2 и CH3. В определенных вариантах осуществления клетка по настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок легкой цепи и предпочтительно участок CL. В определенных вариантах осуществления переменный участок легкой цепи может представлять собой переменный участок общей легкой цепи, как описано в данном документе.

Дополнительно в данном документе предложена клетка, продуцирующая связывающий домен или связывающую молекулу антитела PD-1 человека, которые описаны в данном документе. В определенных вариантах осуществления такая клетка может представлять собой рекомбинантную клетку, которая была трансформирована вектором по настоящему изобретению.

Дополнительно в данном документе предложен способ получения связывающего домена антитела к PD-1 человека или связывающей молекулы, которая содержит связывающий домен антитела к PD-1 человека, по настоящему изобретению, где способ предусматривает культивирование клетки, описанной в данном документе, и выделение связывающего домена антитела к PD-1 человека или связывающей молекулы, содержащей связывающий домен антитела к PD-1 человека, из клетки или супернатанта.

Дополнительно в данном документе предложен способ получения варианта связывающего домена антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, где способ предусматривает следующее:

- создание варианта последовательности вариабельного участка тяжелой цепи, который описан в данном документе; и
- экспрессию варианта последовательности и вариабельного участка легкой цепи, который описан в данном документе, в клетке.

Способы создания вариантов последовательностей хорошо известны в данной области техники. Можно использовать случайный подход при создании вариантов последовательности или целенаправленный подход, при котором можно, например, стремиться к введению модификаций, которые могут повысить или снизить аффинность связывания. Стандартные способы созревания аффинности доменов связывания антител широко известны в данной области техники, см., например, Tabasinezhad M. *et al.* Immunol Lett. 2019;212:106-113. Можно также стремиться к введению модификаций, которые снижают проявляемые риски, с целью получения связывающего домена или

молекулы, содержащей такой связывающий домен, в большом масштабе. Можно ввести модификации, которые, вероятно, не приведут к потере специфичности связывания и/или не повлияют на аффинность связывания. Можно ли аминокислотные остатки в CDR и/или каркасных участках заменить, например, на консервативный аминокислотный остаток и без или практически без утраты специфичности и/или аффинности связывания, можно определить способами, хорошо известными в данной области техники. Экспериментальные примеры включают без ограничения, например, аланиновое сканирование (Cunningham BC, Wells JA. *Science*. 1989;244(4908):1081-5) и глубокое мутационное сканирование (Araya CL, Fowler DM. *Trends Biotechnol*. 2011;29(9):435-42). Также были разработаны вычислительные способы, которые позволяют спрогнозировать влияние модификации аминокислоты, такие как описанные в Sruthi CK, Prakash M. *PLoS One*. 2020;15(1):e0227621, Choi Y. et al. *PLoS One*. 2012;7(10):e46688 и Munro D, Singh M. *Bioinformatics*. 2020;36(22-23):5322–9.

Дополнительно в данном документе предложены любые варианты связывающих доменов антитела к PD-1 человека, полученные описанным выше способом, связывающие молекулы, такие как антитела, содержащие любой из указанных вариантов связывающих доменов, фармацевтическая композиция, содержащая любой из указанных вариантов связывающих доменов или связывающих молекул антитела к PD-1 человека, нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из указанных вариантов связывающих доменов, векторы и клетки, содержащие указанные нуклеиновые кислоты, и применение указанных вариантов связывающих доменов или фармацевтической композиции для лечения рака.

Фармацевтическая композиция и способы

Связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению или связывающую молекулу по настоящему изобретению можно применять в фармацевтической композиции вместе с фармацевтически приемлемым носителем для эффективного лечения заболевания, предпочтительно заболевания, связанного с подавленной иммунной системой, в частности рака.

Лечение предусматривает введение эффективного количества PD-1-связывающего домена, связывающей молекулы или фармацевтической композиции нуждающемуся в этом субъекту.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложены связывающий домен антитела к PD-1 человека, связывающая молекула или фармацевтическая композиция, которые описаны в данном документе, для применения в терапии.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложены связывающий домен антитела к PD-1 человека, связывающая молекула или фармацевтическая композиция для применения при лечении заболевания, связанного с подавленной иммунной системой, в частности рака.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложен способ лечения заболевания, где способ предусматривает введение эффективного количества связывающего домена антитела к PD-1 человека, связывающей молекулы или фармацевтической композиции, которые описаны в данном документе, нуждающемуся в этом индивидууму.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложен способ лечения заболевания, связанного с подавленной иммунной системой, в частности рака, где способ предусматривает введение эффективного количества связывающего домена антитела к PD-1 человека, связывающей молекулы или фармацевтической композиции, которые описаны в данном документе, нуждающемуся в этом индивидууму.

В данном документе термины «индивидуум», «субъект» и «пациент» используются взаимозаменяемо и относятся к млекопитающему, такому как человек, мышь, крыса, хомяк, морская свинка, кролик, кошка, собака, обезьяна, корова, лошадь, свинья и др. (например, пациент, такой как человек-пациент, у которого имеется рак).

Термины «лечить», «осуществлять лечение» и «лечение» в контексте данного документа относятся к любому типу вмешательства или процесса, выполняемого на субъекте или к введению активного средства или комбинации активных средств субъекту с целью излечения заболевания или его симптома или улучшения состояния при заболевании или его симптоме. Сюда относятся обращение вспять, смягчение, облегчение, ингибирование или замедление симптома, осложнения, патологического состояния или биохимических признаков, которые связаны с заболеванием, а также предупреждение возникновения, прогрессирования, развития, ухудшения степени тяжести или повторного появления симптома, осложнения, патологического состояния или биохимических признаков, которые связаны с заболеванием.

В контексте данного документа термин «эффективное лечение» или «положительный терапевтический ответ» относится к лечению, вызывающему благоприятный эффект, например, облегчение по меньшей мере одного симптома заболевания или нарушения, например, рака. Положительный эффект может принимать форму улучшения по сравнению с исходным уровнем, в том числе улучшения по сравнению с результатами измерения или наблюдения, проведенного до начала терапии согласно данному способу. Например, благоприятный эффект может принимать форму замедления, стабилизации, остановки или обращения вспять прогрессирования рака у субъекта на любой клинической стадии, о чем свидетельствует уменьшение или устранение клинического или диагностического симптома заболевания или маркера рака. Эффективное лечение может, например, уменьшить размер опухоли, уменьшить присутствие опухолевых клеток в кровотоке, уменьшить или предупредить метастазы опухоли, замедлить или заблокировать рост опухоли и/или предупредить или задержать повторное появление или рецидив опухоли.

Термин «терапевтическое количество» или «эффективное количество» относится к количеству средства или комбинации средств, которое обеспечивает требуемый биологический, терапевтический и/или профилактический результат. Данный результат может представлять собой уменьшение, облегчение,

временное облегчение, ослабление, задержку и/или смягчение одного или нескольких признаков, симптомов или причин заболевания или любого другого требуемого изменения биологической системы. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое количество представляет собой количество, достаточное для задержки развития опухоли. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое количество представляет собой количество, достаточное для предупреждения или задержки повторного появления опухоли.

Эффективное количество средства или композиции может следующее: (i) уменьшить количество раковых клеток, (ii) уменьшить размер опухоли, (iii) ингибировать, задержать, в некоторой степени замедлить и может остановить инфильтрацию раковых клеток в периферические органы, (iv) ингибировать метастазирование опухоли, (v) ингибировать рост опухоли, (vi) предупредить или задержать возникновение и/или повторное возникновение опухоли и/или (vii) избавить в некоторой степени от одного или нескольких симптомов, связанных с раком.

Эффективное количество может варьировать в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и вес подлежащего лечению индивидуума, а также способность средства или комбинации средств вызывать требуемый ответ у индивидуума.

Эффективное количество можно вводить за одно или несколько введений.

Эффективное количество также включает количество, которое уравнивает любые токсические или вредные эффекты средства или комбинации средств и терапевтически полезные эффекты.

Термин «средство» относится к терапевтически активному веществу, в данном случае к PD-1-связывающему домену по настоящему изобретению, связывающей молекуле по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Общие термины

В контексте данного документа термин «содержать» и сочетания с ним используются в неограничивающем смысле для обозначения, что включены предметы, следующие за данным словом, но не исключены и предметы, которые конкретно не упомянуты.

Формы единственного числа в данном документе используются для обозначения одного или нескольких грамматических объектов в форме единственного числа. Например, «элемент» означает один или несколько элементов.

В данном документе ссылка на патентный документ или другой материал не должна рассматриваться как признание того, что данный документ или материал был известен или что содержащаяся в нем информация была частью общеизвестных сведений на дату приоритета любого из пунктов формулы изобретения.

Все ссылки на патенты и литературу, упомянутые в настоящем описании, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Следует обратить внимание, что в настоящем описании, если не указано иное, положения аминокислот, присвоенные CDR и каркасным участкам в переменном участке антитела или фрагмента антитела, указаны в соответствии с нумерацией по Kabat (см. Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987 и 1991)). Аминокислоты в константных участках указаны согласно системе нумерации EU.

Регистрационные номера в первую очередь приведены для обеспечения дополнительного способа идентификации мишени, фактическая последовательность связанного белка может варьировать, например, по причине мутации в кодирующем гене, такой как мутация, возникающая при некоторых формах рака, или др. Сайт связывания антигена связывает антиген и ряд его вариантов, таких как варианты, которые экспрессируются некоторыми антиген-положительными иммунными или опухолевыми клетками.

При отсылке в данном документе к гену, белку отсылка предпочтительно делается к человеческой форме гена или белка. При отсылке в данном документе к гену или белку отсылка делается к природному гену или белку и к вариантам форм гена или белка, которые можно детектировать в опухолях, различных формах рака и др., предпочтительно, которые можно детектировать в человеческих опухолях, различных формах рака и др.

HGNC означает номенклатурный комитет HUGO Gene. Число, идущее после аббревиатуры, представляет собой регистрационный номер, с помощью которого из базы данных HGNC можно получить информацию о гене и белке, кодируемом данным геном. Entrez Gene предоставляет регистрационный номер или идентификатор гена, с помощью которого из базы данных NCBI (Национальный центр биотехнологической информации) можно получить информацию о гене или белке, кодируемом данным геном. Ensemble предоставляет регистрационный номер, с помощью которого из базы данных Ensemble можно получить информацию о гене или белке, кодируемом данным геном. Ensembl представляет собой совместный проект EMBL-EBI и Wellcome Trust Sanger Institute по разработке системы программного обеспечения, которая создает и поддерживает автоматическую аннотацию на выбранных эукариотических геномах.

Перечень фигур чертежей

На фигурах бивалентные моноспецифические антитела указаны в формате SEQ ID NO: A, где SEQ ID NO: A относится к вариабельной последовательности тяжелой цепи обоих связывающих доменов. Каждый связывающий домен моноспецифических антител содержит легкую цепь. В примерах, которые используются для иллюстрации настоящего изобретения, но не предназначены для какого-либо его ограничения, каждый связывающий домен моноспецифических антител содержит вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 16, и константный участок легкой цепи, характеризующийся

аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 60. Моноспецифические антитела предпочтительно представляют собой антитела IgG1, содержащие CH1, шарнирный участок, CH2 и CH3. В примерах, которые используются для иллюстрации настоящего изобретения, но не предназначены для какого-либо его ограничения, моноспецифические антитела были подвергнуты скринингу в формате IgG1, где PD-1-связывающие тяжелые цепи содержат CH1, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 17, CH2, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 18, и CH3, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 19.

Бивалентное моноспецифическое антитело-аналог ниволумаба указано в формате SEQ ID NO: A/SEQ ID NO: B, где SEQ ID NO: A относится к соответствующей последовательности тяжелой цепи, а SEQ ID NO: B относится к соответствующей последовательности легкой цепи. Данное эталонное антитело-аналог применяют в формате IgG1 или IgG4, и каждый связывающий домен содержит легкую цепь.

Бивалентные биспецифические антитела указаны в формате SEQ ID NO: A×антигенA, где SEQ ID NO: A относится к вариательной последовательности тяжелой цепи PD-1-связывающего домена, а «антиген A» относится к вариательной последовательности тяжелой цепи неродственного, произвольно выбранного антигена. Каждый связывающий домен биспецифических антител содержит легкую цепь. Биспецифические антитела представляют собой антитела IgG1, содержащие CH1, шарнирный участок, CH2 и CH3.

На фигуре 1 представлены результаты скрининга вариантов с созревшей аффинностью в анализе PD-1/PD-L1 по гену-репортеру. А) IgG, содержащие вариательные участки тяжелой цепи с созревшей аффинностью, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 6, сравнивали с исходным

антителом, содержащим вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 9, аналогом ниволумаба (SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 14) в качестве положительного контроля и отрицательным контролем (SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 16). В) IgG, содержащие вариабельные участки тяжелой цепи с созревшей аффинностью, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, сравнивали с исходным антителом, содержащим вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 10, аналогами ниволумаба (SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 14) в качестве положительных контролей и отрицательным контролем (SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 16).

На фигуре 2 представлена аффинность связывания PD-1-связывающих доменов, содержащих вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 5, в бивалентном моноспецифическом формате по сравнению с бивалентным моноспецифическим аналогом 1 ниволумаба (SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 14, в четырех экземплярах) и PD-1-связывающим доменом аналога 1 ниволумаба в составе бивалентного биспецифического антитела (SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 14 x SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 16).

На фигуре 3 показана аффинность связывания биспецифических антител, содержащих последовательность под SEQ ID NO: 7, а также связывающий домен к произвольно выбранному антигену, не влияющий на протестированное в анализе связывание PD-1, и последовательность под SEQ ID NO: 8, а также связывающий домен к произвольно выбранному антигену, не влияющий на протестированное в анализе связывание PD-1, к PD-1 человека и яванского макака по сравнению с аналогом ниволумаба (SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 14).

Настоящее изобретение проиллюстрировано в представленных далее примерах, но они не предназначены для какого-либо его ограничения.

Примеры

Пример 1. Получение связывающих доменов антитела к PD-1 человека

Связывающие домены антитела к PD-1 человека можно получить способами, известными в данной области техники, такими как, например, описанные в WO 2019/009728. Получали большую панель переменных участков тяжелой цепи путем иммунизации трансгенных мышей, характеризующихся наличием общей легкой цепи IGKV1-39 (мышей MeMo®), антигенными молекулами PD-1 человека, в том числе путем доставки различных форм ДНК, белка и клеточного антигена. Для созревания аффинности были выбраны переменные участки тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. В результате получали 202 варианта с созревшей аффинностью, некоторые из которых были отобраны для дополнительного изучения характеристик в анализе PD-1/PD-L1 по гену-репортеру.

Пример 2. Эффективность IgG к PD-1

Для подтверждения того, что переменные участки тяжелой цепи к PD-1 с созревшей аффинностью в формате IgG по меньшей мере столь же эффективны, как и их исходные IgG, варианты с созревшей аффинностью подвергали скринингу в анализе PD-1/PD-L1 по гену-репортеру. В анализ также были включены исходные IgG к PD-1, антитело к PD-1, содержащее переменный участок тяжелой цепи (SEQ ID NO: 11) и переменный участок легкой цепи (SEQ ID NO: 14) ниволумаба (аналог 1 ниволумаба в форме IgG1 с подвергнутым сайленсингу Fc), и антитело к PD-1, содержащее переменный участок тяжелой цепи (SEQ ID NO: 12) и переменный участок легкой цепи (SEQ ID NO: 14) ниволумаба (аналог 2 ниволумаба в форме IgG4), в качестве положительных контролей, а также антитело к RSV-G, содержащее переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся последовательностью

под SEQ ID NO: 15, и вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся последовательностью под SEQ ID NO: 16, в качестве отрицательного контроля. Последние 2 лунки в данном вертикальном ряду оставляли без IgG в качестве контроля основного уровня.

Анализ PD-1 – PD-L1 по гену-репортеру проводили согласно протоколу производителя (Promega, каталожный № J1255), который предусматривает применение двух линий клеток: клеток aAPC/CHO-K1 с PD-L1, которые представляют собой клетки CHO-K1, экспрессирующие PD-L1 человека и сконструированный белок на клеточной поверхности, предназначенный для активации родственных TCR антиген-независимым способом (Promega, каталожный № J109A); а также эффекторные клетки с PD-1: Т-клетки Jurkat, экспрессирующие PD-1 человека и ген-репортер люциферазы, управляемый элементом, чувствительным к NFAT (NFAT-RE) (Promega, каталожный № J115A).

В день 1 готовили среду для восстановления клеток с PD-L1 при комнатной температуре: 10% FBS (Sigma, каталожный № F2442) в DMEM/F12 (Life Technologies, каталожный № 21765). Необходимое количество флаконов с клетками с PD-L1 (J109A; 1 флакон на 32 подлежащих тестированию IgG) извлекали из морозильной камеры, быстро оттаивали при температуре 37°C и клетки переносили в 50-мл пробирку. Среду для восстановления клеток медленно добавляли к клеткам, 14,5 мл/флакон, удваивая объем за минуту. Лунки планшетов с площадью лунки ½ от стандартного размера (Corning, каталожный № 3688) заполняли данной суспензией клеток в количестве 50 мкл/лунку или посредством 50 мкл PBS (Invitrogen, каталожный № 10010). Аналитические планшеты инкубировали в течение ночи при температуре 37°C, в условиях 5% CO₂ и 95% относительной влажности.

На второй день готовили 2× концентрированный аналитический буфер: 4% FBS (Sigma, каталожный № F2442) в RPMI 1640 (набор от Promega или Life Technologies, каталожный № 21875) при комнатной температуре. 2×

концентрированные растворы тестируемого и контрольного IgG готовили в PBS. Серийные разведения тестируемых и контрольных IgG также производили в PBS в планшетах с U-образным дном (Nunc, каталожный № 268152), начиная с 10 мкг/мл и выполняя 6-ступенчатое 4-кратное титрование. Серийные разведения IgG положительного и отрицательного контроля готовили в PBS на отдельных планшетах с глубокими лунками (Greiner Bio-one, каталожный № 780270). Также готовили основной контроль, который представляет собой контроль без IgG. IgG, активность которых необходимо было сравнивать напрямую, инкубировали в максимально возможной степени на одном и том же планшете во избежание отклонения, возникающего при использовании различных планшетов.

Аналитические планшеты вынимали из инкубатора и стряхиванием опустошали лунки. В аналитический планшет вносили 20 мкл раствора IgG, начиная с переноса наиболее низкой концентрации IgG, за которой следовали более высокие концентрации, с помощью одних и тех же наконечников пипетки.

Требуемое количество эффекторных клеток с PD-1 (J115A: 1 флакон на 32 подлежащих тестированию IgG) извлекали из морозильной камеры, быстро оттаивали при 37°C и осторожно перемешивали посредством пипетирования вверх и вниз. Клетки из всех флаконов переносили в 50-мл пробирку. К клеткам медленно добавляли 2× концентрированный аналитический буфер (5,9 мл на флакон с клетками) так, чтобы объем удваивался за минуту. В лунки на аналитических планшетах вносили 20 мкл суспензии эффекторных клеток. Планшеты инкубировали в течение 6 часов при температуре 37°C, в условиях 5% CO₂ и 95% относительной влажности. После 6-часовой инкубации планшеты предварительно инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин.

Люциферазную активность измеряли с применением системы для люциферазного анализа Bio-Glo™ (Promega, каталожный № G7941). Буфер для люциферазного анализа Bio-Glo™ (защищенный от света) уравнивали до комнатной температуры в течение ночи и тщательно смешивали с субстратом

для люциферазного анализа Bio-Glo™. В каждую лунку аналитического планшета вносили 40 мкл люциферазы Bio-Glo и спустя 5-10 мин измеряли люминесценцию на планшет-ридере EnVision (PerkinElmer, модель 2104-0040A, режим измерения люминесценции). Показания прибора получали в значениях относительных световых единиц (RLU). Кратность индукции, которая представляет собой соотношение экспериментальной активности к контрольной активности, рассчитывали как значение RLU для IgG-X / значение RLU в лунке без IgG. Кратность индукции наносили на график в зависимости от log концентраций IgG и строили сигмовидную кривую в GraphPad Prism с применением нелинейной регрессии и уравнения log(ингибитора) в зависимости от ответа (три параметра).

Результаты представлены на фигуре 1. У всех контролей наблюдали ожидаемые значения активности, и они были сходными на разных планшетах. Варианты с созревшей аффинностью были по меньшей мере столь же эффективны, как и их исходный IgG, и столь же эффективны или более эффективны, чем аналог 1 ниволумаба. Значения EC50 вариантов с созревшей аффинностью и исходных антител представлены в таблице 1.

IgG, содержащий VH, характеризующийся аминокислотной последовательностью:	EC50 (нМ)	EC50 (нМ) аналог ниволумаба
SEQ ID NO: 1	3,81	3,47
SEQ ID NO: 2	4,49	
SEQ ID NO: 6	2,87	
SEQ ID NO: 9	5,65	
SEQ ID NO: 5	4,91	5,79
SEQ ID NO: 4	4,12	
SEQ ID NO: 3	4,20	
SEQ ID NO: 10	11,05	

Таблица 1. Значения EC50 вариантов с созревшей аффинностью и исходных антител

Пример 3. Характеристики связывания

Аффинность связывания выбранных PD-1-связывающих доменов с созревшей аффинностью определяли с помощью метода SPR. Аффинность связывания с PD-1 человека определяли в бивалентном моноспецифическом формате IgG и сравнивали с аффинностью связывания бивалентных моноспецифических аналогов эталонного антитела ниволумаб и бивалентного биспецифического антитела, содержащего связывающий домен, характеризующийся последовательностью эталонного антитела ниволумаб, и связывающий домен, который связывает неродственную мишень.

Эксперименты методом SPR проводили с применением прибора Biacore 8K (GE Healthcare) при температуре 25°C. Рабочий буфер для SPR (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества P20, pH 7,4) готовили из 10× буфера HBS-EP (GE Healthcare). Антитела к Fc человека (GE Healthcare) иммобилизовали посредством аминного связывания на всех шестнадцати проточных ячейках сенсорного чипа CM5 Series S (GE Healthcare). Уровни иммобилизации составляют ~9000 RU для всех проточных ячеек. Требуемого уровня захвата (100-150 RU) антител к PD-1 достигали путем пропускания соответствующей концентрации антител к PD-1 через активную проточную ячейку каждого канала в течение 60 секунд со скоростью потока 10 мкл/мин. Затем в течение 240 секунд (время ассоциации) вводили серию концентраций трехкратного серийного разведения PD-1 (всего 7 концентраций, наиболее высокая на уровне 300 нМ), приготовленную из исходного раствора PD-1 (8986-PD от R&D) и рабочего буфера (концентрация 0), сразу после этого вводили рабочий буфер в течение 480 секунд (время диссоциации) при скорости потока 45 мкл/мин. Поверхность регенерировали 30-секундным введением 3 M MgCl₂ со скоростью потока 30 мкл/мин. Кинетику связывания и параметры

аффинности получали путем глобальной аппроксимации данных к модели связывания 1:1.

Данные представлены на фигуре 2. IgG, содержащие PD-1-связывающие домены по настоящему изобретению, характеризуются по меньшей мере в десять раз более высокой аффинностью связывания (K_D), чем аналоги эталонного антитела.

Аффинность связывания также определяли в биспецифическом формате IgG с помощью метода SPR на приборе BIAcore-T200 с применением антитела к huIgG, иммобилизованного на сенсорном чипе CM5 Series S. Также оценивали, могут ли с биспецифическими антителами одновременно взаимодействовать два человеческих белка. Аффинность связывания биспецифических антител, содержащих PD-1-связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся последовательностью под SEQ ID NO: 7, или PD-1-связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся последовательностью под SEQ ID NO: 8, определяли к PD-1 человека и PD-1 яванского макака. Применяемый формат антитела представляет собой антитело к PD-1 $\times$ антигену А, где «антиген А» представляет собой произвольно выбранный антиген, не вступающий в реакцию с PD-1 и не влияющий на тестируемое в анализе связывание PD-1. Каждый связывающий домен биспецифических антител содержит тяжелую цепь и легкую цепь. Аффинность связывания биспецифических антител сравнивали с аффинностью связывания аналога эталонного антитела под названием ниволумаб, который содержит два связывающих домена антитела к PD-1.

Применяемыми эталонными антителами были следующие: аналог ниволумаба (SEQ ID NO: 13/ SEQ ID NO: 14) и эталонное антитело к антигену А. В качестве отрицательного контроля связывания применяли антитело к неродственной мишени. Тестируемые антитела представляли собой SEQ ID NO: 7 $\times$ антиген А и SEQ ID NO: 8 $\times$ антиген А.

Применяемыми мономерными рекомбинантными антигенами были следующие: антиген А человека, антиген А яванского макака, huPD-1 (huPD-1-His, Sino

Biological, каталожный № 10377-H08H) и cyPD-1 (cyPD-1-His, R&D Systems, каталожный № 8509-PD).

Иммобилизация

Иммобилизацию антитела козы к Fc huIgG (JIR, каталожный № 109-005-098) на четырех проточных каналах сенсорного чипа CM5 (GE Healthcare; каталожный № BR-1005-30) осуществляли путем аминного связывания с применением 40 мкг/мл антитела, разведенного в 10 мМ ацетате, pH 5,0. Применяли следующие условия: время активации 420 секунд, время дезактивации 420 секунд, буфер для дезактивации: 1 М этаноламин, pH 8,5. Была достигнута высокая плотность иммобилизации в диапазоне 9158-9428 RU.

Определение аффинности

Для определения аффинности тестируемые и контрольные антитела захватывали антителом к huIgG, иммобилизованным на сенсорном чипе CM5, при скорости потока 30 мкл/мин в течение 60 секунд только в одной проточной ячейке. Концентрация захваченных антител составляла 20 нМ для определения аффинности к PD-1 и 10 нМ для определения аффинности к антигену А. После этого шел период стабилизации продолжительностью 60 секунд с использованием буфера со скоростью потока 30 мкл/мин. Пятистадийные двукратные серийные разведения антигенов вводили со скоростью 30 мкл/мин в течение 60 секунд как в проточную ячейку с захваченным антителом, так и в эталонную проточную ячейку (без захваченного антитела). Концентрации антигена составляли от 80 нМ до 2,5 нМ для huPD-1 и cyPD-1 и от 40 до 1,25 нМ для антигена А человека и антигена А яванского макака. Коррекцию по фону для буферных эффектов производили путем введения только буфера, а для вычитания фона использовали эталонную проточную ячейку.

После взаимодействия между антителом и антигеном для определения скорости диссоциации проводили промывку в течение 300 секунд со скоростью 30 мкл/мин. Регенерацию между циклами осуществляли с помощью двух

введений по 15 мкл 10 mM глицина, pH 1,5, со скоростью 30 мкл/мин, после чего шла стадия стабилизации в течение 90 секунд со скоростью 90 мкл/мин. Для подтверждения полной регенерации и сопоставимости результатов анализа в конце анализа и для всех протестированных антигенов проводили повторный цикл анализа эталонного антитела со всеми протестированными концентрациями антигена.

Буфер HBS-EP+ применяли для определения аффинности к PD-1, тогда как в случае антигена А буфер HBS-EP+ дополняли посредством NaCl до конечной концентрации 500 mM NaCl во избежание неспецифического связывания.

Результаты анализировали в программном обеспечении Biacore T200 Evaluation Software. Из необработанного сигнала в RU вычитали холостой сигнал (канал без захваченного антитела) и корректировали по фону для учета буферных эффектов (вычитание цикла с захваченным антителом, но с буфером во втором введении вместо антигена). Для расчета скорости ассоциации (k_a), скорости диссоциации (k_d) и аффинности (KD) к набору кривых образцов применяли модель связывания 1:1 по Ленгмюру с использованием опции одновременной аппроксимации в программном обеспечении Biacore T200 Evaluation Software.

У захваченных биспецифических и эталонных антител наблюдали связывание с соответствующими рекомбинантными антигенами. Не наблюдали связывания антигена с антителом отрицательного контроля.

Обзор данных представлен на фигуре 3. В случае huPD-1 два биспецифических антитела характеризовались схожей аффинностью, у обоих наблюдали более чем 10-кратное уменьшение KD по сравнению с эталонным аналогом антитела ниволумаб, главным образом за счет наблюдаемой более медленной диссоциации. В случае cyPD-1-His для SEQ ID NO: 7 × антиген А наблюдали примерно 10-кратное уменьшение по сравнению с аналогом ниволумаба, главным образом за счет более медленной диссоциации.

Одновременное связывание

Одновременное связывание биспецифических антител с антигеном А человека и huPD-1 анализировали с помощью системы, схожей с той, что использовали для определения аффинности. Для захвата биспецифических антител использовали иммобилизованное антитело к huIgG. В качестве положительного контроля включали смесь эталонного антитела-аналога ниволумаба и эталонного антитела к антигену А, а в качестве отрицательного контроля включали антитело к неродственной мишени. Затем для того, чтобы занять все сайты связывания антигена, на 300 секунд вводили один из антигенов в насыщающей концентрации (80 нМ в случае huPD-1 и 40 нМ в случае антигена А человека). Последовательно вводили второй антиген в той же концентрации, что и при введении 1, либо отдельно, либо в комбинации с первым антигеном (для обеспечения того, чтобы все сайты связывания оставались занятыми). Для предупреждения неспецифического связывания антигена А человека в течение всего процесса применяли буфер с высоким содержанием солей.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO: 1 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSNGSLG**FDFW**SWIRQPPGRGLEWIG**YIYY**
SGSWSLNPSFKGRVTMSVDTSKNQFSLNLRSVTAADTAVYYCARG**GGYTGY**
GGDWFDPWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 2 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSNGSLG**FEFW**SWIRQPPGRGLEWIG**YIVY**
SGSHSVSPSLKTRVTMSVDTSKNQFSLNLRSVTAADTAVYYCARG**GGYTGHG**
GDWFDTWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 3 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**RFAL**SWVRQAPGQGLEWMG**WI**
DPNTGTPTYAQDFTGRFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR**SLGYC**
GSDICYPNGILDNWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 4 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**RFAV**NWVRQAPGQGLEWMG**W**
IDPNTGTPTYAQGVTNRFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR**SLGY**
CSSDICYPNLIFDNWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 5 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**RFAL**HWVRQAPGQGLEWMG**W**
IDPNTGTPTFAQGVTGRFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR**SLGY**
CDSDICYPNWIFDNWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 6 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDGSIG**YHFWS**WIRQPPGRGLEWIG**YIVY**
SGSYNVNPSLKTRVTMSVDTSKNQFSLNLRSVTAADTAVYYCARG**GGYTGYG**
GDWFDPWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 7 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSEGSIG**YHFWS**WIRQPPGRGLEWIG**YIVYS**
GSYNVNPSLKTRVTMS

VDTSKNQFSLNLRSVTAADTAVYYCARG**GGYTGYGGDWFDP**WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 8 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**RFALH**WVRQAPGQGLEWMGW
IDPNTGTPTFAQGVTGRFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR**SLGY**
CDSDICYPNWIFDNWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 9 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSNGSLG**FYFWS**WIRQPPGRGLEWIG**YIYY**
SGSTSFNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLNLRSVTAADTAVYYCARG**GGYTGYG**
GDWFDPWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 10 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**RFTMS**WVRQAPGQGLEWMGW
INPNTGNPTYAQDFTGGRFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR**ILGYC**
NTDNCYPNWIFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 11 – Тяжелая цепь, аналог 1 ниволумаба

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
WYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 12 – Тяжелая цепь, аналог 2 ниволумаба

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
WYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKVD
KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 13 – Тяжелая цепь, аналог 4 ниволумаба

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
WYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKVD
KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGF

YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 14 – Легкая цепь ниволумаба

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR
ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 15 – Вариабельный участок тяжелой цепи

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
SYDGSTKYSADSLKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRADDTAVYYCAKEGWSF
DSSGYRSWFD SWGQGT LVT

SEQ ID NO: 16 – Вариабельный участок легкой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе IMGT

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSY**LNWYQQKPGKAPKLLIY**AASSL**
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPPT**FGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 17 – CH1 WT

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

SEQ ID NO: 18 – CH2

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAK

SEQ ID NO: 19 – CH3

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

SEQ ID NO: 20 – Вариабельный участок тяжелой цепи аналога ниволумаба

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
WYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDY
WGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 21 – Вариабельный участок легкой цепи аналога ниволумаба

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR
ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 22 – HCDR1 согласно системе Kabat

FYFWS

SEQ ID NO: 23 – HCDR2 согласно системе Kabat

YIYYSGSTSFNPSLKS

SEQ ID NO: 24 – HCDR3 согласно системе Kabat

GGYTGYGGDWFD P

SEQ ID NO: 25 – HCDR1 согласно системе Kabat

FDFWS

SEQ ID NO: 26 – HCDR2 согласно системе Kabat

YIYYSGSWSLNPSFKG

SEQ ID NO: 27 – HCDR3 согласно системе Kabat

GGYTGYGGDWFD P

SEQ ID NO: 28 – HCDR1 согласно системе Kabat

FEFWS

SEQ ID NO: 29 – HCDR2 согласно системе Kabat

YIVYSGSHSVSPSLKT

SEQ ID NO: 30 – HCDR3 согласно системе Kabat

GGYTGHGGDWFDT

SEQ ID NO: 31 – HCDR1 согласно системе Kabat

RFALS

SEQ ID NO: 32 – HCDR2 согласно системе Kabat

WIDPNTGTPTYAQDFTG

SEQ ID NO: 33 – HCDR3 согласно системе Kabat

SLGYCGSDICYPNGILDN

SEQ ID NO: 34 – HCDR1 согласно системе Kabat

RFAVN

SEQ ID NO: 35 – HCDR2 согласно системе Kabat

WIDPNTGTPTYAQGVNTN

SEQ ID NO: 36 – HCDR3 согласно системе Kabat

SLGYC SSDICYPNLIFDN

SEQ ID NO: 37 – HCDR1 согласно системе Kabat

RFALH

SEQ ID NO: 38 – HCDR2 согласно системе Kabat

WIDPNTGTPTFAQGV TG

SEQ ID NO: 39 – HCDR3 согласно системе Kabat

SLGYCDS DICYPNWIFDN

SEQ ID NO: 40 – HCDR1 согласно системе Kabat

YHFWS

SEQ ID NO: 41 – HCDR2 согласно системе Kabat

YIVYSGSYNVNPSLKT

SEQ ID NO: 42 – HCDR3 согласно системе Kabat

GGYTGYGGDW FDP

SEQ ID NO: 43 – HCDR1 согласно системе Kabat

YHFWS

SEQ ID NO: 44 – HCDR2 согласно системе Kabat

YIVYSGSYNVNPSLKT

SEQ ID NO: 45 – HCDR3 согласно системе Kabat

GGYTGYGGDW FDP

SEQ ID NO: 46 – HCDR1 согласно системе Kabat

RFALH

SEQ ID NO: 47 – HCDR2 согласно системе Kabat

WIDPNTGTPTFAQGV TG

SEQ ID NO: 48 – HCDR3 согласно системе Kabat

SLGYCDSIDICYPNWIFDN

SEQ ID NO: 49 – LCDR1 согласно системе IMGT

QSISSY

SEQ ID NO: 50 – LCDR2 согласно системе IMGT

AAS

SEQ ID NO: 51 – LCDR3 согласно системе IMGT

QQSYSTPPT

SEQ ID NO: 52 – Вариабельный участок легкой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе IMGT

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 53 – Вариабельный участок легкой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе IMGT

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAST
RATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 54 – Вариабельный участок легкой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе IMGT

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS
RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 55 – Вариабельный участок легкой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе IMGT

SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKSVYWYQQKSGQAPVLVIYYDS
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDHWVFGGGTK
LTVL

SEQ ID NO: 56 – V-участок

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP

SEQ ID NO: 57 – V-участок

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAST
RATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWP

SEQ ID NO: 58 – V-участок

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS
RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP

SEQ ID NO: 59 – V-участок

SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKSVYWYQQKSGQAPVLVIYYDSDR
PSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDH

SEQ ID NO: 60 – Константный участок легкой цепи

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

Первоначально поданная формула изобретения

1. Связывающий домен антитела к PD-1 человека, характеризующийся более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека, где эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека содержит вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, и вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 21.
2. Связывающий домен антитела к PD-1 человека, который при наличии в моновалентной форме в бивалентном антителе обеспечивает сопоставимую, или равную, или более высокую эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1, чем эталонное антитело к PD-1 человека, где эталонное антитело к PD-1 человека содержит два вариабельных участка тяжелой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, и два вариабельных участка легкой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 21.
3. Связывающий домен антитела к PD-1 человека по п. 1 или п. 2, где связывающий домен антитела к PD-1 человека содержит по меньшей мере вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, и где вариабельный участок легкой цепи предпочтительно представляет собой вариабельный участок легкой цепи из легкой цепи, которая способна образовывать пары с множеством тяжелых цепей, характеризующихся специфичностью к различным эпитопам.
4. Связывающий домен антитела к PD-1 человека по п. 1 или п. 3, где аффинность связывания измерена методом поверхностного плазмонного резонанса.
5. Связывающий домен антитела к PD-1 человека по любому из пп. 1-4, где связывающий домен антитела к PD-1 человека характеризуется по меньшей мере

в десять раз более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем у эталонного связывающего домена антитела к PD-1 человека.

6. Связывающий домен антитела к PD-1 человека по любому из пп. 1-4, где связывающий домен антитела к PD-1 человека характеризуется в десять раз более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем у эталонного связывающего домена антитела к PD-1 человека.

7. Связывающий домен антитела к PD-1 человека по любому из пп. 1-6, где связывающий домен антитела к PD-1 человека характеризуется аффинностью связывания с PD-1 человека в диапазоне приблизительно 0,1-1,0 нМ, в частности в диапазоне приблизительно 0,3-0,8 нМ, более конкретно в диапазоне приблизительно 0,38-0,78 нМ.

8. Связывающий домен антитела к PD-1 человека по любому из пп. 1 и 3-7, где аффинность связывания измерена как с использованием связывающего домена антитела к PD-1 человека, так и с использованием эталонного связывающего домена антитела к PD-1 человека в бивалентном моноспецифическом формате IgG.

9. Связывающий домен антитела к PD-1 человека по любому из пп. 1 и 3-7, где аффинность связывания измерена с использованием связывающего домена антитела к PD-1 человека в бивалентном биспецифическом формате IgG и с использованием эталонного связывающего домена антитела к PD-1 человека в бивалентном моноспецифическом формате IgG.

10. Связывающий домен антитела к PD-1 человека по пп. 2, 3 или 5-9, где эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1 измерена в анализе PD-1/PD-L1 по гену-репортеру.

11. Связывающий домен антитела к PD-1 человека по пп. 2, 3 или 5-10, где сопоставимая эффективность блокирования связывания лиганда с активной молекулой PD-1 представляет собой эффективность в пределах 5-кратного диапазона эффективности блокирования связывания лиганда с PD-1 эталонного

антитела к PD-1 человека, включая 5-, 4-, 3- и 2-кратное отклонение от эффективности блокирования связывания лиганда с PD-1 эталонного антитела к PD-1 человека.

12. Связывающий домен антитела к PD-1 человека по любому из пп. 1-11, где переменный участок тяжелой цепи содержит следующее:

a) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24, соответственно;

b) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27, соответственно;

c) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, соответственно;

d) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 33, соответственно;

e) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36, соответственно;

f) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью,

которая изложена под SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39, соответственно;

g) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, соответственно;

h) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 45, соответственно; или

i) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48, соответственно;

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены.

13. Связывающий домен антитела к PD-1 человека по любому из пп. 1-12, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 1-9, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

14. Связывающий домен антитела к PD-1 человека по любому из пп. 3-13, дополнительно содержащий участок CH1 и CL.

15. Связывающий домен антитела к PD-1 человека, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, где вариабельный участок тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) из вариабельного участка тяжелой цепи,

характеризующегося аминокислотной последовательностью из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 1-9, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) из переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 1-9, и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) из переменных участков тяжелой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 1-9.

16. Связывающий домен антитела к PD-1 человека по п. 15, где переменный участок тяжелой цепи содержит следующее:

a) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24, соответственно;

b) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27, соответственно;

c) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, соответственно;

d) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 33, соответственно;

e) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью,

которая изложена под SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36, соответственно;

f) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39, соответственно;

g) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, соответственно;

h) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 45, соответственно; или

i) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48, соответственно;

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены.

17. Связывающий домен антитела к PD-1 человека по п. 15 или п. 16, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 1-9, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

18. Связывающий домен антитела к PD-1 человека по любому из пп. 15-17, дополнительно содержащий участок CH1 и CL.

19. Связывающая молекула, содержащая связывающий домен антитела к PD-1 по любому из пп. 1-18.

20. Связывающая молекула по п. 19, где связывающая молекула представляет собой моноспецифическую связывающую молекулу, предпочтительно бивалентное моноспецифическое антитело.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество связывающего домена антитела к PD-1 человека по любому из пп. 1-18 или связывающей молекулы по п. 19 или п. 20 и фармацевтически приемлемый носитель.

22. Связывающий домен антитела к PD-1 человека по любому из пп. 1-18, связывающая молекула по п. 19 или п. 20 или фармацевтическая композиция по п. 21 для применения в терапии.

23. Связывающий домен антитела к PD-1 человека по любому из пп. 1-18, связывающая молекула по п. 19 или п. 20 или фармацевтическая композиция по п. 21 для применения при лечении заболевания, связанного с подавленной иммунной системой.

24. Связывающий домен антитела к PD-1 человека по любому из пп. 1-18, связывающая молекула по п. 19 или п. 20 или фармацевтическая композиция по п. 21 для применения при лечении рака.

25. Способ лечения заболевания, предусматривающий введение эффективного количества связывающего домена антитела к PD-1 по любому из пп. 1-18, связывающей молекулы по п. 19 или п. 20 или фармацевтической композиции по п. 21 нуждающемуся в этом индивидууму.

26. Способ лечения заболевания, связанного с подавленной иммунной системой, предусматривающий введение эффективного количества связывающего домена

антитела к PD-1 по любому из пп. 1-18, связывающей молекулы по п. 19 или п. 20 или фармацевтической композиции по п. 21 нуждающемуся в этом индивидууму.

27. Способ лечения рака, предусматривающий введение эффективного количества связывающего домена антитела к PD-1 по любому из пп. 1-18, связывающей молекулы по п. 19 или п. 20 или фармацевтической композиции по п. 21 нуждающемуся в этом индивидууму.

28. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая переменный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к PD-1 человека по любому из пп. 1-18.

29. Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты по п. 28.

30. Вектор по п. 29, где вектор дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую участок CH1 и предпочтительно шарнирный участок, участок CH2 и CH3.

31. Вектор по п. 29 или п. 30, где вектор дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок легкой цепи и предпочтительно участок CL.

32. Вектор по п. 31, где переменный участок легкой цепи представляет собой переменный участок легкой цепи из легкой цепи, которая способна образовывать пары с множеством тяжелых цепей, характеризующихся специфичностью к различным эпитопам.

33. Клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к PD-1 человека по любому из пп. 1-18.

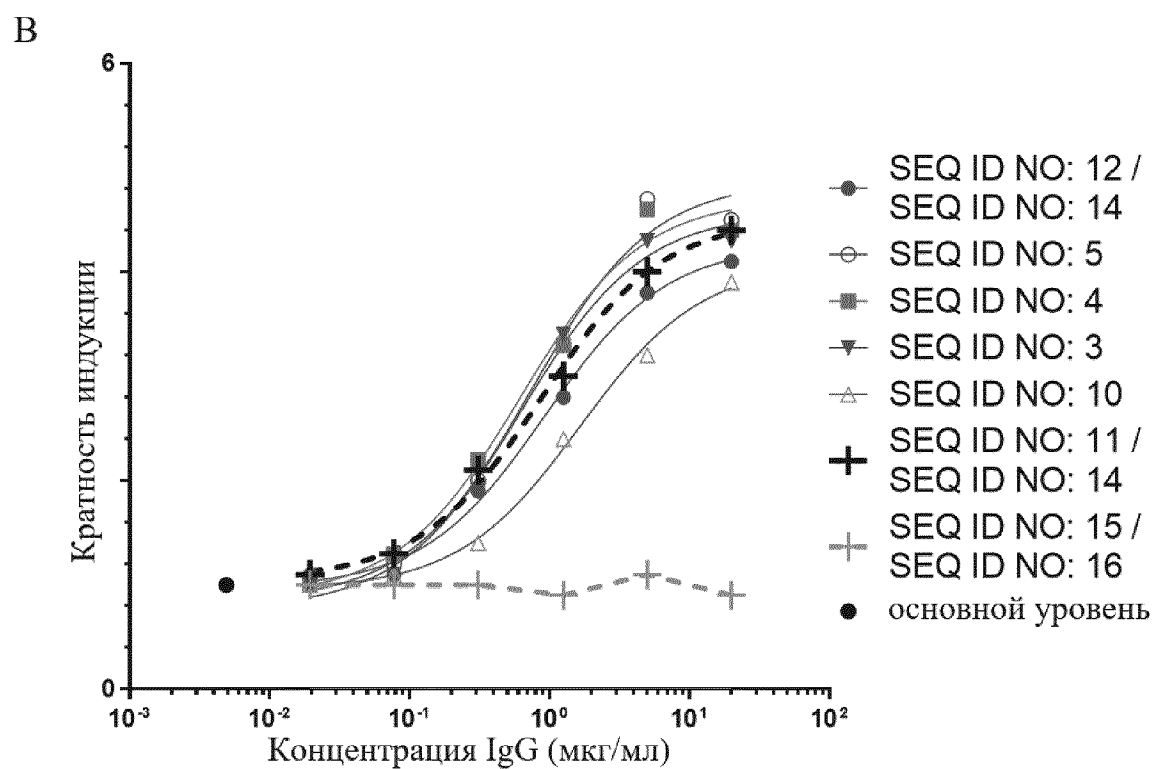
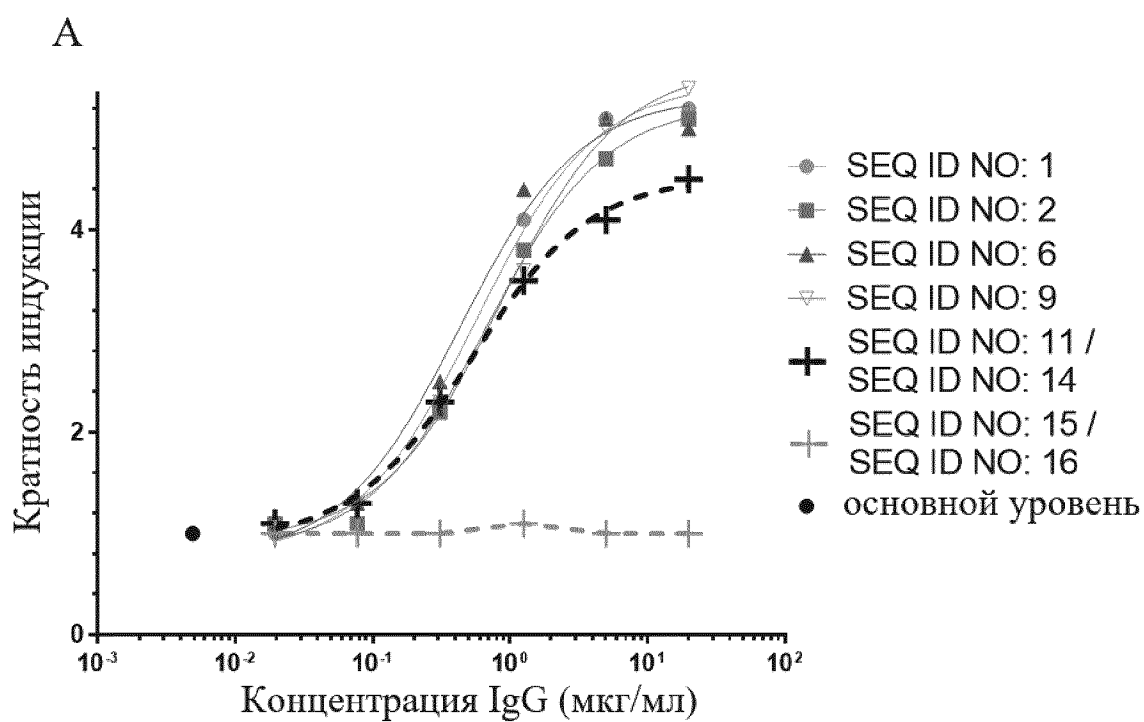
34. Клетка по п. 33, где клетка дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую участок CH1 и предпочтительно шарнирный участок, участок CH2 и CH3.

35. Клетка по п. 33 или п. 34, где клетка дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок легкой цепи и предпочтительно участок CL.

36. Клетка, продуцирующая связывающий домен антитела к PD-1 человека по любому из пп. 1-18, или связывающую молекулу по п. 19 или п. 20.

37. Клетка по п. 36, где указанная клетка представляет собой рекомбинантную клетку, которая была трансформирована вектором по любому из пп. 29-32.

Фиг. 1



Фиг. 2

IgG, содержащий PD-1-связывающий домен с SEQ ID NO:	K_{on}	K_{off}	K_D
SEQ ID NO: 1	6,67E+05	2,55E-04	3,82E-10
SEQ ID NO: 6	2,48E+05	1,93E-04	7,81E-10
SEQ ID NO: 5	3,95E+05	2,18E-04	5,51E-10
SEQ ID NO: 11 / SEQ ID NO: 14 x SEQ ID NO: 15 / SEQ ID NO: 16	2,13E+05	1,59E-03	7,49E-09
SEQ ID NO: 11 / SEQ ID NO: 14	2,16E+05	1,68E-03	7,77E-09
SEQ ID NO: 11 / SEQ ID NO: 14	2,08E+05	1,62E-03	7,78E-09
SEQ ID NO: 11 / SEQ ID NO: 14	2,07E+05	1,64E-03	7,92E-09
SEQ ID NO: 11 / SEQ ID NO: 14	1,71E+05	1,63E-03	9,54E-09

Фиг. 3

Антиген	huPD-1			cyPD-1			Одновременное связывание
Антитело	K_{on} (1/Mc)	K_{off} (1/c)	K_D (нМ)	K_{on} (1/Mc)	K_{off} (1/s)	K_D (нМ)	
SEQ ID NO: 7 x антиген А	3,08E+05	1,20E-04	0,39	2,94E+05	1,29E-04	0,44	Да
SEQ ID NO: 8 x антиген А	3,23E+05	1,05E-04	0,32	3,35E+05	9,76E-04	2,91	Да
Эталонное антитело Антиген А	-	-	-	-	-	-	-
SEQ ID NO: 13 / SEQ ID NO: 14	2,18E+05	1,44E-03	6,66	2,20E+05	8,50E-04	3,89	-