



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 15/63 (2006.01); C07K 16/2803 (2006.01); A61K 39/395 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016128487, 13.07.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.07.2016

Дата регистрации:
31.05.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.07.2016

(45) Опубликовано: 31.05.2018 Бюл. № 16

Адрес для переписки:

198515, Санкт-Петербург, Петродворцовый
район, п. Стрельна, ул. Связи, 34, лит. А, ЗАО
"БИОКАД", Филюриной В.А.

(72) Автор(ы):

Екимова Виктория Михайловна (RU),
Коржавин Дмитрий Валерьевич (RU),
Черных Юлия Сергеевна (RU),
Неманкин Тимофей Александрович (RU),
Соловьев Валерий Владимирович (RU),
Владиминова Анна Константиновна (RU),
Буланкина Ирина Андреевна (RU),
Дидук Сергей Васильевич (RU),
Гончарова Ольга Владимировна (RU),
Ерошова Анна Владимировна (RU),
Устюгов Яков Юрьевич (RU),
Артюхова Марина Владимировна (RU),
Улитин Андрей Борисович (RU),
Иванов Роман Алексеевич (RU),
Морозов Дмитрий Валентинович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Закрытое Акционерное Общество
"БИОКАД" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 20160159905 A1 от 09.06.2016.
US 20160131646 A1 от 12.05.2016. WO
2016068801 A1 от 06.05.2016. US 20160052990
A1 от 25.02.2016. RU 2571204 C2 от 20.12.2015.

(54) АНТИ-PD-1-АНТИТЕЛА, СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое связывается с рецептором PD-1 человека. Также раскрыты: молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая указанное антитело, экспрессионный вектор, содержащий указанную молекулу нуклеиновой кислоты, клетка-хозяин, экспрессирующая указанное антитело, фармацевтическая композиция, содержащая

указанное антитело. Раскрыты способ получения указанной клетки-хозяина, способ получения указанного антитела, способ ингибирования активности PD-1 с помощью указанного антитела, способ лечения заболевания с помощью указанного антитела. Изобретение позволяет эффективно лечить заболевания, ассоциированные с PD-1. 9 н. и 10 з.п. ф-лы, 12 ил., 5 табл., 23 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 656 181**⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 15/63 (2006.01); *C07K 16/2803* (2006.01); *A61K 39/395* (2006.01)

(21)(22) Application: **2016128487, 13.07.2016**

(24) Effective date for property rights:
13.07.2016

Registration date:
31.05.2018

Priority:

(22) Date of filing: **13.07.2016**

(45) Date of publication: **31.05.2018** Bull. № 16

Mail address:

198515, Sankt-Peterburg, Petrodvortsovyj rajon, p. Strel'na, ul. Svyazi, 34, lit. A, ZAO "BIOKAD", Filyurinoj V.A.

(72) Inventor(s):

**Ekimova Viktoriya Mikhajlovna (RU),
Korzhavin Dmitrij Valerevich (RU),
Chernykh Yuliya Sergeevna (RU),
Nemankin Timofej Aleksandrovich (RU),
Solovev Valerij Vladimirovich (RU),
Vladimirova Anna Konstantinovna (RU),
Bulankina Irina Andreevna (RU),
Diduk Sergej Vasilevich (RU),
Goncharova Olga Vladimirovna (RU),
Eroshova Anna Vladimirovna (RU),
Ustyugov Yakov Yurevich (RU),
Artyukhova Marina Vladimirovna (RU),
Ulitin Andrej Borisovich (RU),
Ivanov Roman Alekseevich (RU),
Morozov Dmitrij Valentinovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

Zakrytoe Aktsionernoe Obschestvo "BIOKAD" (RU)

(54) **ANTI-PD-1 ANTIBODIES, METHOD FOR THEIR PRODUCTION, AND METHOD OF APPLICATION**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biochemistry, namely to antibody or antigen-binding fragment thereof that binds to a human PD-1 receptor. There are also disclosed: nucleic acid molecule encoding said antibody, expression vector comprising said nucleic acid molecule, host cell expressing said antibody, pharmaceutical composition comprising said antibody.

Method for producing said host cell, method of producing said antibody, method of inhibiting PD-1 activity by said antibody, method of treating a disease with said antibody are disclosed.

EFFECT: invention allows to effectively treat diseases associated with PD-1.

19 cl, 12 dwg, 5 tbl, 23 ex

Область техники

Изобретение относится к биотехнологии и представляет собой выделенные моноклональные антитела, в частности моноклональные антитела человека, которые специфически связываются с PD-1 с высокой аффинностью. Антитела согласно изобретению могут быть химерными, гуманизированными или человеческими антителами, или их антигенсвязывающими фрагментами и могут использоваться в качестве лекарственного средства в онкологии и иммуноонкологии, для терапии заболеваний, связанных с различными нарушениями пролиферации и развития клеток. Изобретение также относится к способам получения указанных антител и способу лечения заболеваний человека с помощью данных антител.

Уровень техники

Белок программируемой смерти 1 (PD-1) является ингибиторным членом семейства рецепторов CD28, которое включает в себя также CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD-1 экспрессируется активированными В-клетками, Т-клетками и миелоидными клетками (Agata et al., supra; Okazaki et al. (2002) *Curr. Opin. Immunol.* 14: 391779-82; Bennet et al. (2003) *J Immunol* 170: 711-8). Первоначальные члены данного семейства, CD28 и ICOS, были обнаружены по функциональным действиям на увеличение пролиферации Т-клеток после добавления моноклональных антител (Hutloff et al. (1999) *Nature* 397: 263-266; Hansen et al. (1980) *Immunogenetics* 10: 247-260). PD-1 был обнаружен скринингом на дифференциальную экспрессию в апоптотических клетках (Ishida et al. (1992) *EMBO J* 11: 3887-95). Другие члены данного семейства, CTLA-4 и BTLA, были обнаружены скринингом на дифференциальную экспрессию в цитотоксических Т-лимфоцитах и ТН1-клетках, соответственно. CD28, ICOS и CTLA-4, все, имеют неспаренный остаток цистеина, дающий возможность гомодимеризации. В противоположность этому, предполагается, что PD-1 существует в виде мономера, не имея неспаренного остатка цистеина, характерного для других членов семейства CD28.

PD-1 является трансмембранным белком типа I 55 кДа, который является частью суперсемейства генов Ig (Agata et al. (1996) *Int Immunol* 8: 765-72). PD-1 содержит мембранопротоксимальный иммунорецепторный ингибирующий мотив на основе тирозина (ITIM) и мембранодистальный мотив переключения на основе тирозина (ITSM) (Thomas, M.L. (1995) *J Exp Med* 181: 1953-6; Vivier, E и Daeron, M (1997) *Immunol Today* 18: 286-91). PD-1, хотя и является структурно сходным с CTLA-4, лишен мотива MYPPPY, который является критическим для связывания В7-1 и В7-2. Были идентифицированы два лиганда для PD-1, PD-L1 и PD-L2, которые, как было показано, отрицательно регулируют активацию Т-клеток после связывания с PD-1 (Freeman et al. (2000) *J Exp Med* 192: 1027-34; Latchman et al. (2001) *Nat Immunol* 2: 261-8; Carter et al. (2002) *Eur J Immunol* 32: 634-43). Как PD-L1, так и PD-L2 являются гомологами В7, которые связываются с PD-1, но не связываются с другими членами семейства CD28.

Один лиганд для PD-1, PD-L1, является избыточным в различных типах рака человека (Dong et al. (2002) *Nat. Med.* 8: 787-9). Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 приводит к снижению количества инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, уменьшению опосредованной рецептором Т-клеток пролиферации и ускользанию от иммунологического надзора раковых клеток (Dong et al. (2003) *J. Mol. Med.* 81: 281-7; Blank et al. (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54: 307-314; Konishi et al. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10: 5094-100). Иммуносупрессия может быть обращена ингибированием локального взаимодействия PD-1 с PD-L1, и это действие является аддитивным при блокировании взаимодействия PD-1 с PD-L2 (Iwai et al. (2002) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 99: 12293-7; Brown et al. (2003) *J. Immunol.* 170: 1257-66).

PD-1 является ингибирующим членом семейства CD28, экспрессируемым на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках (Agata et al., supra; Okazaki et al. (2002) *Curr Opin Immunol* 14: 391779-82; Bennett et al. (2003) *J Immunol* 170: 711-8). PD-1-недостаточные животные развивают различные аутоиммунные фенотипы, включая аутоиммунную кардиопатию и подобный волчанке синдром с артритом и нефритом (Nishimura et al. (1999) *Immunity* 11: 141-51; Nishimura et al. (2001) *Science* 291: 319-22). Кроме того, было обнаружено, что PD-1 играет роль в аутоиммунном энцефаломиелите, системной красной волчанке, болезни трансплантат против хозяина (GVHD), диабете типа I и ревматоидном артрите (Salama et al. (2003) *J Exp Med* 198: 71-78; Prokunina and Alarcon-Riquelme (2004) *Hum Mol Genet* 13:R143; Nielsen et al. (2004) *Lupus* 13:510). Было показано, что в линии мышинных опухолевых В-клеток ITSM PD-1 является необходимым для блокирования BCR-опосредованного входа Ca^{2+} и фосфорилирования тирозина, находящихся ниже по ходу процесса эффекторных молекул (Okazaki et al. (2001) *PNAS* 98: 13866-71).

В настоящее время существует ряд антител против PD-1, например, nivolumab (BMS-936558, MDX-1106 или ONO-4538; BMS), pembrolizumab (Merck).

Так в предшествующем уровне техники раскрыты моноклональные антитела против PD-1, состоящие из определенных аминокислотных последовательностей согласно международной заявке WO 2006/121168 (nivolumab, BMS), которые проявляют определенные полезные свойства. Такие свойства включают, например, высокую аффинность связывания с PD-1 человека, но отсутствие существенной перекрестной реактивности с CD28, CTLA-4 или ICOS человека. Кроме того, было показано, что данные антитела модулируют иммунные реакции. Таким образом, в данной заявке также описан способ модуляции иммунных реакций с использованием анти-PD-1-антител. В частности, настоящее изобретение обеспечивает способ ингибирования роста опухолевых клеток *in vivo* с использованием анти-PD-1-антител.

Также в предшествующем уровне техники раскрыт выделенный PD-1-связывающий белок, описанный в международной заявке WO2009/114335 (pembrolizumab, Мерк), который содержит первую вариабельную область и вторую вариабельную область. Первая вариабельная область является тяжелой цепью с различными CDRs, а вторая представляет собой легкую цепь, также с различными CDRs.

Таким образом, является актуальной разработка антител, которые распознают PD-1, и способы применения таких агентов. Согласно настоящему изобретению предложены антитела, которые специфически связываются с PD-1 и имеют преимущественные характеристики функциональной активности, аффинности, специфичности и стабильности в исследуемых тестах.

Краткое описание изобретения

Изобретение относится к моноклональным антителам человека, которые специфически связываются с PD-1. Такие антитела могут быть использованы для лечения онкологических и инфекционных заболеваний. По сравнению с существующими в настоящее время способами лечения таких заболеваний, включая лечение антителами, предполагается, что моноклональные антитела по настоящему изобретению могут обеспечить наилучший клинический ответ.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, обладающие способностью связываться с рецептором PD-1 человека, которые содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 75% гомологичную последовательности SEQ ID NO: 3.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу или

его фрагменту, которые содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, которые содержат в себе:

- последовательность переменного домена тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 75% гомологична последовательности SEQ ID NO: 7, и
- последовательность переменного домена легкой цепи, по меньшей мере на 75% гомологична последовательности SEQ ID NO: 8.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий фрагмент конкурирует за связывание или связывается с тем же эпитопом, что связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий фрагмент по меньшей мере на 90% гомологичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7. В одном варианте осуществления настоящее изобретение связывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В одном варианте осуществления настоящее изобретение связывающий домен может быть гуманизирован.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуется тем, что оно относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его фрагмент имеет последовательность тяжелой цепи, гомологичную не менее чем на 90% последовательности SEQ ID NO 9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его фрагмент имеет последовательность легкой цепи, гомологичную не менее чем на 90% последовательности SEQ ID NO 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc константная часть антитела или его фрагмента содержат любые мутации, понижающие или устраняющие любую из эффекторных функций ADCC, ADCP или CDC в сравнении с природной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc константная часть антитела или его фрагмента содержат мутации, увеличивающие значение фармакокинетических параметров в животном или человеке, такие как $t_{1/2\beta}$ (час) или C_{max} (мкг/мл).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют по меньшей мере одно из следующих свойств:

а) агрегационную стабильность, что при концентрациях более 10 мг/мл и хранении при $T=4^{\circ}\text{C}$ в течение более чем 6 месяцев содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5% от исходного содержания в растворе;

б) агрегационную стабильность, что при концентрациях более 10 мг/мл и при повышении температуры до 37°C в течение более чем 2 недель содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5% от исходного содержания в растворе;

с) агрегационную стабильность, что при концентрациях более 10 мг/мл и повышении температуры до 50°C в течение более чем 6 часов содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5% от исходного содержания в растворе;

d) константу диссоциации при связывании с PD-1 человека KD не более 10^{-9} (M);

e) кинетическую константу ассоциации при связывании с PD-1 человека $kon(1/Ms)$ не

менее 10^5 (1/Мс);

f) кинетическую константу диссоциации при связывании с PD-1 человека $\text{dis}(1/\text{s})$ не более 10^{-4} (1/с).

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу, которое содержит любой антигенсвязывающий фрагмент антитела описанный ранее.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий домен по любому из пп. 1-14.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, который содержит любую из выделенных молекул нуклеиновой кислоты описанную в данном документе.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к клетке-хозяина, которая содержит любую нуклеотидную последовательность описанную в данном документе.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения клетки-хозяина, который включает трансфекцию подходящей исходной клетки экспрессионным вектором.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения любого антитела описанного в данном документе, содержащий получение клетки-хозяина, культивирование клетки-хозяина, в условиях, достаточных для получения указанного антитела или его фрагмента, с последующим выделением и очисткой полученного антитела или его активного фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая антитело или фрагмент антитела, описанные выше, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция предназначена для лечения онкологических и инфекционных заболеваний.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу ингибирования биологической активности PD-1 у субъекта, нуждающегося в таком ингибировании, который включает введение субъекту эффективного количества любого антитела описанного ранее в данном документе.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, нуждающегося в таком лечении, который содержит введение пациенту любого антитела или антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции, описанные в данном документе.

Описание чертежей

Фиг. 1 - схема синтеза комбинаторной наивной библиотеки человека.

Фиг. 2 - фагида для клонирования Fab фаговых дисплейных библиотек (А) и экспрессионная плазмида для наработки Fab (Б).

Фиг. 3 - электрофореграмма BCD-100 в восстанавливающих условиях (3А, 12% SDS-PAGE), в невосстанавливающих условиях (3Б, 8% SDS-PAGE).

Фиг. 4 - иммуноферментный анализ взаимодействия BCD-100 с PD1 и другими антигенами.

Фиг. 5 - реактивация NFAT-сигналинга анти-PD1 антителами в репортерной клеточной линии Jurkat-NFAT-PD1.

Фиг. 6 - стимуляция продукции ИЛ-2 ант-PD1 антителами в цельной крови человека в присутствии стафилококкового энтеротоксина

Фиг. 7 - анализ антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) антитела против PD1 на линии клеток Jurkat-PD1.

Фиг. 8 - анализ взаимодействий кандидатов BCD-100 с FcRn и Fcγ-рецепторами на приборе Octet RED 96.

Фиг. 9 - иммуноферментный анализ взаимодействий BCD-100 с рецепторами PD1 разных организмов.

5 Фиг. 10 - иммуноферментный анализ взаимодействия BCD-100 с рецепторами из семейства CD28.

Фиг. 11 - анализ взаимодействий кандидатов BCD-100 с рецепторами PD1 человека и обезьяны циномолгуса на приборе Octet RED 96.

Фиг. 12 - результаты термостресса (50°C, 12 ч) молекулы BCD-100.

10 Подробное описание изобретения

Определения и общие методы

Если иное не определено в настоящем документе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, которые обычно понятны специалистам в данной области. Примерные способы и материалы описаны
15 ниже, хотя на практике или при тестировании настоящего изобретения могут также использоваться способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем документе. Все публикации и другие ссылочные материалы, упомянутые в настоящем документе, включены во всей их полноте путем отсылки. В случае противоречий настоящее описание, включая определения, будет превалировать. Хотя
20 в настоящем документе цитируется ряд документов, такое цитирование не является признанием того, что любой из этих документов образует часть общеизвестных знаний в данной области.

Кроме того, если по контексту не требуется иное, термины в единственном числе включают в себя термины во множественном числе, и термины во множественном
25 числе включают в себя термины в единственном числе. Как правило, используемая классификация и методы клеточной и тканевой культуры, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, аналитической химии, химии органического синтеза, медицинской и фармацевтической химии, а также гибридизации и химии белка и нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, хорошо известны
30 специалистам и широко применяются в данной области. Ферментные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителя, как это обычно осуществляется в данной области, или как описано в настоящем документе.

В этом описании и вариантах осуществления изобретения слова «иметь» и «содержать» или их вариации, такие как «имеет», «имеющий», «содержит» или
35 «содержащий», следует понимать как включение указанного целого или группы целых, но не исключение любого другого целого или группы целых.

Определения, связанные с антителами

Термины «программируемая гибель 1», «программируемая гибель клеток 1», «белок PD-1», «PD-1», «CD279», «PDCD1», «hPD-1» и «hPD-1» используются взаимозаменяемо
40 и включают варианты, изоформы, видовые гомологи PD-1 человека и аналоги, имеющие, по меньшей мере, один общий эпитоп с PD-1.

Термины «иммунный ответ», «аутоиммунная реакция» и «аутоиммунное воспаление» относятся, например, к действию лимфоцитов, антиген-представляющих клеток, фагоцитирующих клеток, гранулоцитов и растворимых макромолекул, вырабатываемых
45 указанными клетками или клетками печени (включая антитела, цитокины и комплемент, образующиеся в результате селективного повреждения, разрушения или элиминации из человеческого организма инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых клеток или, в случаях аутоиммунитета или патологического

воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей).

Термин «связывающая молекула» включает в себя антитела, иммуноглобулины и антигенсвязывающие части антитела. Термин «антитело» (Ab) или «иммуноглобулин» (Ig) при использовании в настоящем документе относится к тетрамеру, содержащему две тяжелые (H) цепи (около 50-70 кДа) и две легкие (L) цепи (около 25 кДа), связанных друг с другом дисульфидными мостиками. Каждая тяжелая цепь состоит из переменного домена тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Каждая легкая цепь состоит из переменного домена легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Домены VH и VL могут быть далее подразделены на гипервариабельные участки, именуемые «участками, определяющими комплементарность» (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, именуемые «каркасными областями» (FR). Каждый VH и VL состоит из трех CDR-участков (H-CDR в данном документе обозначает CDR из тяжелой цепи и L-CDR в данном документе обозначает CDR из легкой цепи) и четырех каркасных областей FRs, отходящие от amino-конца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Приписывание аминокислот к каждому региону может осуществляться в соответствии с определениями IMGT® (Lefranc et al., Dev Comp Immunol 27(1): 55-77 (2003); или определениями Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 and 1991)); Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); или Chothia et al., Nature 342: 878-883 (1989).

Термин «антитело» и «иммуноглобулин» являются взаимозаменяемыми в контексте данной заявки.

Термин «антигенсвязывающая часть» антитела (или «часть антитела», «фрагмент») при использовании в настоящем документе относится к одной или более частям или фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, PD1). Было показано, что некоторые фрагменты полноразмерного антитела могут выполнять функцию антигенсвязывающего антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемые термином «антигенсвязывающая часть», включают (i) а Fab-фрагмент: моновалентный фрагмент, состоящий из VL, VH, CL и CH1 доменов; (ii) F(ab')₂-фрагмент: двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из VH и CH1 доменов; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из VL и VH доменов одного плеча антитела, (v) фрагмент однодоменного антитела (dAb), который состоит из VH домена; и (vi) выделенный участок, определяющий комплементарность (CDR), способный специфически связываться с антигеном. Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с использованием рекомбинантных способов синтетическим линкером, который позволяет им иметь вид одной цепи белка, в которой VL и VH области спариваются, образуя моновалентные молекулы (известные как одноцепочечные Fv (scFv)). Также в рамках данного изобретения представлены антигенсвязывающие молекулы, содержащие V- и/или VL. В случае VH, молекула может также содержать одну или более из CH1, шарнирной, CH2 или CH3 области. Такие одноцепочечные антитела также охватываются термином «антигенсвязывающая часть» антитела. Также охватываются и другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела. Диатела представляют собой двухвалентные, биспецифичные антитела, в которых VH и VL домены экспрессируются на одной полипептидной цепи, но с использованием линкера, который является слишком

коротким для спаривания двух доменов одной и той же цепи, тем самым заставляя домены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавая два антигенсвязывающих участка. Участки антител, такие как Fab- и F(ab')₂-фрагменты, могут быть получены из целых антител с использованием традиционных методов, таких как папаиновый или пепсиновый гидролиз целых антител. Более того, антитела, части антител и молекулы иммуноадгезии могут быть получены с использованием стандартных методов рекомбинантной ДНК, например, как описано в настоящем документе.

Термин «рекомбинантное антитело» означает антитело, которое экспрессируется из клетки или клеточной линии, содержащей нуклеотидную последовательность (нуклеотидные последовательности), которая кодирует антитело, при этом указанная нуклеотидная последовательность (нуклеотидные последовательности) не ассоциирована с клеткой в природе.

Термин «вариантное» антитело, используемый в данном документе, относится к антителу, имеющему аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности его «родительского» антитела путем добавления, удаления и/или замены одного или более аминокислотных остатков относительно последовательности родительского антитела. В предпочтительном варианте осуществления изобретения вариантное антитело содержит по меньшей мере одно или более (например, от одного до двенадцати, например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять, десять, одиннадцать или двенадцать; и в некоторых вариантах осуществления изобретения от одного до примерно десяти) добавлений, делеций и/или замен аминокислот относительно родительского антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения добавления, делеций и/или замены осуществляются на CDR-участках вариантного антитела. Идентичность или гомология по отношению к последовательности вариантного антитела определяется в настоящем документе как процент аминокислотных остатков в последовательности вариантного антитела, которые идентичны остаткам родительского антитела, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если это необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательности. Вариантное антитело сохраняет способность связываться с тем же антигеном, и предпочтительно эпитопом, с которым связывается родительское антитело, и в некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одно свойство или биологическая активность превосходит аналогичные свойства родительского антитела. Например, вариантное антитело может иметь, например, более выраженную аффинность связывания, более длительный период полувыведения, более низкое значение ИК₅₀ или повышенную способность подавлять биологическую активность антигена по сравнению с родительским антителом. Особый интерес в настоящем документе представляет вариантное антитело, показывающее биологическую активность, превышающую по меньшей мере в 2 раза (предпочтительно, по меньшей мере в 5 раз, 10 раз или 20 раз) биологическую активность родительского антитела.

Термин «химерное антитело» относится в широком смысле к антителу, которое содержит одну или более областей из одного антитела, и одну или более областей из одного или нескольких других антител, как правило, антитело, частично человеческого происхождения и частично нечеловеческого происхождения, то есть полученное частично из не относящегося к человеку животного, например, мыши, крысы или другого грызуна или верблюдовых, таких как лама или альпака. Химерные антитела являются предпочтительными по сравнению с нечеловеческими антителами для того, чтобы снизить риск иммунного ответа, направленного против антител у человека,

например, ответа, направленного против мышинных тел у человека в случае мышиногo антитела. Примером типичного химерного антитела является то, в котором последовательности вариабельного участка являются мышинными, в то время как последовательности константного участка являются человеческими. В случае химерного антитела нечеловеческие части могут быть подвергнуты дальнейшему изменению с целью гуманизации антитела.

Термин «гуманизация» относится к факту, что когда антитело имеет полностью или частично нечеловеческое происхождение, например, антитело мыши или ламы, полученное при иммунизации мышей или лам, соответственно, с представляющим интерес антигеном, или является химерным антителом на основе такого антитела мыши или ламы, можно заменить некоторые аминокислоты, в частности, в каркасных областях и константных доменах тяжелой и легкой цепей, с тем чтобы избежать или свести к минимуму иммунный ответ у человека. Специфичность взаимодействия антитела с антигеном-мишенью присуща главным образом аминокислотным остаткам, расположенных в шести CDR-участках тяжелой и легкой цепи. Поэтому аминокислотные последовательности внутри CDR-участков, являются гораздо более вариабельными между отдельными антителами, по сравнению с последовательностями вне CDR-участков. Поскольку последовательности CDR участков отвечают за большинство антитело-антиген взаимодействий, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства специфического природного антитела, или в более общем плане какого-либо специфического антитела с данной аминокислотной последовательностью, например, путем конструирования экспрессионных векторов, которые экспрессируют последовательности CDR-участков из специфического антитела в каркасные последовательности другого антитела. В результате, можно «гуманизировать» нечеловеческое антитело и в значительной степени сохранить специфичность связывания и аффинность исходного антитела. Несмотря на то что невозможно точно предсказать иммуногенность и тем самым иммунный ответ, направленный против антитела у человека, на конкретное антитело, нечеловеческие антитела, как правило, более иммуногенны, чем человеческие антитела. Химерные антитела, у которых инородные (например, грызуна или верблюда) константные участки были заменены последовательностями человеческого происхождения, показали в целом более низкую иммуногенность, чем антитела полностью инородного происхождения, и существует тенденция использовать в терапевтических антителах гуманизированные или полностью человеческие антитела. Химерные антитела или другие антитела нечеловеческого происхождения, таким образом, могут быть гуманизированы, чтобы снизить риск иммунного ответа, направленного против антитела, у человека.

Для химерных антител, гуманизация обычно включает в себя модификацию каркасных участков последовательностей вариабельного участка. Аминокислотные остатки, которые являются частью участков, определяющих комплементарность (CDR участков), чаще всего не будут изменяться в связи с гуманизацией, хотя в некоторых случаях это может быть желательным, чтобы изменить отдельные аминокислотные остатки CDR-участка, например, чтобы удалить участок гликозилирования, участок дезамидирования, участок изомеризации аспартата или нежелательный остаток цистеина или метионина. N-связанное гликозилирование происходит путем присоединения олигосахаридной цепи к остатку аспарагина в трипептидной последовательности Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, где X может быть любой аминокислотой, кроме Pro. Удаление участка N-гликозилирования может быть достигнуто путем мутирования Asn или Ser/Thr остатка другим остатком, предпочтительно путем консервативной замены. Дезамидирование

остатков аспарагина и глутамина может происходить в зависимости от таких факторов, как pH и обнажение поверхности. Остатки аспарагина особенно восприимчивы к дезамидированию, прежде всего, если они присутствуют в последовательности Asn Gly, и в меньшей степени в других дипептидных последовательностях, таких как Asn-Ala.

- 5 При наличии такого дезамидированного участка, в частности, Asn-Gly в последовательности CDR-участка, может быть предпочтительным удалить этот участок, как правило, путем консервативной замены для удаления одного из вовлеченных остатков.

- В данной области техники известны многочисленные способы гуманизации последовательности антитела; см., например, обзор Almagro & Fransson, *Front Biosci.* 13: 1619-1633 (2008). Одним из наиболее часто используемых методов является трансплантация CDR-участков, например, когда химерные антитела мышинного происхождения задействуют идентификацию человеческих зародышевых генных эквивалентов к мышинным генам варибельного участка и трансплантацию последовательностей мышинных CDR-участков в этот каркас. Трансплантация CDR участка может быть основана на определениях CDR-участков по Kabat, хотя в более поздней публикации (Magdelaine-Beuzelin et al., *Crit Rev. Oncol Hematol.* 64:210 225 (2007)) предполагается, что определение по IMGT® (the international ImMunoGeneTics information system®, www.imgt.org) может улучшить результат гуманизации (см Lefranc et al. *Dev.* 20 *Comp Immunol.* 27: 55-77 (2003)). В некоторых случаях, трансплантация CDR-участка может уменьшить специфичность и аффинность связывания, и, следовательно, биологическую активность, в CDR трансплантированном нечеловеческом антителе, по сравнению с родительским антителом, из которого получены CDR-участки. Обратные мутации (иногда именуемые «ремонт каркасного участка»), могут применяться в 25 выбранных положениях CDR трансплантированного антитела, как правило, в каркасных участках, для того, чтобы восстановить специфичность и аффинность связывания родительского антитела. Определение позиций для возможных обратных мутаций может быть выполнено с использованием информации, имеющейся в литературе и в базах данных антител. Аминокислотные остатки, которые являются кандидатами для 30 обратных мутаций, как правило, расположены на поверхности молекулы антитела, в то время как остатки, которые углублены или имеют низкую степень обнажения поверхности обычно не будут подвержены изменениям. Метод гуманизации, альтернативный трансплантации CDR-участка и обратной мутации, представляет собой изменение поверхности, при котором неэкспонированные на поверхности остатки 35 нечеловеческого происхождения, сохраняются, в то время как экспонированные на поверхности остатки изменяются в человеческие остатки.

- В некоторых случаях может также быть предпочтительным изменение одного или более остатков аминокислот CDR-участков с целью повышения аффинности связывания с целевым эпитопом. Это известно как «созревание аффинности» и в некоторых случаях 40 может выполняться в связи с гуманизацией, например, в ситуациях, когда гуманизация антитела приводит к снижению специфичности или аффинности связывания, и не представляется возможным в достаточной степени улучшить специфичность или аффинность связывания с помощью только обратных мутаций. Различные методы созревания аффинности известны в данной области техники, например, способ *in vitro* сканирующего насыщающего мутагенеза, описанный Burks et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 412-417 (1997), и способ пошагового *in vitro* созревания аффинности, предложенный Wu et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6037 6042 (1998).

Термин «выделенный белок», «выделенный полипептид» или «выделенное антитело»

относится к белку, полипептиду или антителу, которые в силу своего происхождения или источника получения, (1) не ассоциированы с ассоциированными в природе компонентами, сопутствующими им в нативном состоянии, (2) свободны от других белков того же вида, (3) экспрессированы клеткой другого вида или (4) не встречаются в природе. Таким образом, полипептид, который химически синтезирован или синтезирован в клеточной системе, отличной от клетки, из которой он происходит в природных условиях, будет «выделенным» из своих ассоциированных в природе компонентов. Белок может быть также по существу освобожден от ассоциированных в природе компонентов посредством выделения с использованием способов очистки белков, хорошо известных в данной области.

Используемый в данном документе термин «зародышевый» относится к нуклеотидным и аминокислотным последовательностям генов антител и генных сегментов, как они передаются от родителей к потомству через зародышевые клетки. Последовательности зародышевой линии отличаются от нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела в зрелых В-клетках, которые были изменены в результате событий рекомбинации и сверхмутации во время созревания В-клеток. Антитело, которое «использует» конкретную последовательность зародышевой линии, имеет нуклеотидную и аминокислотную последовательности, которые согласовываются с той нуклеотидной последовательностью или аминокислотной последовательностью зародышевой линии, которой более полно соответствуют, чем с любой другой нуклеотидной или аминокислотной последовательностями зародышевой линии.

Термин «аффинность» относится к измерению притяжения между антигеном и связывающей молекулой, например, антителом. Внутренняя способность к притяжению связывающей молекулы по отношению к антигену, как правило, выражается как константа равновесия аффинности связывания (KD) конкретного взаимодействия связывающей молекулы и антигена. Считается, что связывающая молекула специфически связывается с антигеном, когда KD составляет ≤ 1 мМ, предпочтительно ≤ 100 нМ. AKD константа связывания аффинности может быть измерена, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore™) или биослойной интерферометрии, например, с использованием системы ProteOn™ XPR36 SPR от Bio-Rad или системы Octet™.

Термин «Ka», как использовано в данном описании, относится к скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как термин «Kd» относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Термин «Kd» в данном описании относится к константе диссоциации, которую получают из отношения Kd к Ka (т.е. Kd/Ka), и ее выражают в виде молярной концентрации (M). Величины Kd для антител могут быть определены с использованием способов, хорошо установленных в данной области.

Предпочтительным способом определения Kd антитела является способ с использованием резонанса поверхностных плазмонов, предпочтительно с использованием биосенсорной системы, такой как система Biacore®.

Как использовано в данном описании, термин «высокая аффинность» в отношении IgG-антитела относится к антителу, имеющему Kd 10^{-8} M, более предпочтительно 10^{-9} M или менее и, даже более предпочтительно, 10^{-10} M или менее в отношении антигена-мишени. Однако «высокая аффинность» связывания может варьироваться для других изоформ антигена. Например, «высокая аффинность» связывания для изоформы IgM

относится к антителу, имеющему $KD\ 10^{-7}M$ или менее, более предпочтительно 10^{-8} Мили менее, даже более предпочтительно $10^{-9}M$ или менее.

Термин « K_{off} » относится к константе скорости диссоциации конкретного

5 взаимодействия связывающей молекулы и антигена. Константу скорости диссоциации k_{off} + можно измерить посредством биослойной интерферометрии, например, с помощью системы Octet™.

Термин «эпитоп» при использовании в данном документе относится к части (детерминанте) антигена, который специфически связывается со связывающей молекулой
 10 (например, и антитело или родственная молекула, такие как биспецифичная связывающая молекула). Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или углеводы, или боковые цепи Сахаров, и, как правило, имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики зарядов. Эпитоп может быть
 15 «линейным» или «конформационным». В линейном эпитопе, все точки взаимодействия между белком (например, антиген) и взаимодействующей молекулой (такой как антитело) происходит линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка. В конформационном эпитопе, точки взаимодействия происходят через аминокислотные остатки на белке, отделенные друг от друга в первичной
 20 аминокислотной последовательности. Когда желаемый эпитоп антигена определен, можно генерировать антитела к этому эпитопу с использованием методик, хорошо известных в данной области техники. Кроме того, генерация и характеристика антител или других связывающих молекул могут пролить свет на информацию о желательных эпитопах. Основываясь на этой информации, можно затем конкурентно скринировать
 25 связывающие молекулы для связывания с теми же или аналогичными эпитопами, например, путем проведения исследований конкуренции, чтобы найти связывающие молекулы, которые конкурируют за связывание с антигеном. Термин «эпитоп», как используется в данной заявке, кроме того, относится к части полипептида, которая обладает антигенной и/или иммуногенной активностью у животного, предпочтительно
 30 млекопитающего, например мыши или человека. Термин «антигенный эпитоп», как используется в данной заявке, определяется как часть полипептида, с которой может специфически связываться антитело, определенная любым способом, хорошо известным из уровня техники, например при помощи традиционного иммунного анализа. Антигенные эпитопы не обязательно должны быть иммуногенными, но могут также
 35 быть иммуногенными. «Иммуногенный эпитоп», как используется в данной заявке, определяется как часть полипептида, который вызывает отклик антитела у животного, как устанавливается любым способом, известным из уровня техники. «Нелинейный эпитоп» или «конформационный эпитоп» содержат несмежные полипептиды (или аминокислоты) в пределах антигенного протеина, с которым антитело, специфическое
 40 к эпитопу, связывается.

Можно определить, связывается ли антитело или другая связывающая молекула с тем же эпитопом или перекрестно конкурирует за связывание с PD1 связывающей молекулой по данному изобретению, используя хорошо известные в данной области техники методы. В одном варианте осуществления изобретения возможно связывание
 45 молекулы, предложенной в данном изобретении, с PD1 в условиях насыщения с последующим измерением способности испытуемого антитела связываться с указанным антигеном-мишенью. Если испытуемое антитело способно связываться с антигеном-мишенью в одно время с референсной связывающей молекулой, то испытуемое антитело

связывается с эпитопом, отличным от эпитопа референсной связывающей молекулы. Тем не менее, если испытуемое антитело не способно связываться с антигеном-мишенью одновременно, то испытуемое антитело связывается с тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или эпитопом, который находится в непосредственной близости от эпитопа, связанного с связывающей молекулой. Этот эксперимент может быть выполнен с использованием ИФА, РИА, анализа межмолекулярных взаимодействий на BIACORE™, биослойной интерферометрии или проточной цитометрии. Для того, чтобы проверить, кросс конкурирует ли связывающая молекула по данному изобретению с другой связывающей молекулой, можно использовать описанный выше способ конкурентного анализа в двух направлениях, то есть определить, блокирует ли известная связывающая молекула испытуемую связывающую молекулу, и наоборот. Такие эксперименты по перекрестной конкуренции могут быть выполнены, например, с помощью прибора IBIS MX96 SPR или системы Octet™.

В одном варианте осуществления изобретения связывающая молекула, предложенная в данном изобретении, представляет собой моноклональное антитело. Используемое в данном документе сокращение «mAb» относится к моноклональному антителу, то есть антителу, которые синтезировано и выделено отдельной клональной популяцией клеток. Клональная популяция может быть клональной популяцией immortalized клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения immortalized клетки в клональной популяции являются гибридными клетками, гибридами, которые обычно получают путем слияния отдельных В-лимфоцитов от иммунизированных животных с отдельными клетками лимфоцитарной опухоли. Гибридомы представляют собой тип сконструированных клеток и не встречаются в природе.

Класс (изотип) и подкласс антител может быть определен любым способом, известным в данной области техники. В целом, класс и подкласс антитела может быть определен с помощью антител, специфичных к конкретному классу и подклассу антител. Такие антитела коммерчески доступны. Класс и подкласс может быть определен с помощью ИФА, вестерн-блот анализа, а также другими методами. В другом варианте класс и подкласс может быть определен посредством секвенирования всех или части константных доменов тяжелой и/или легкой цепей антител, сравнения их аминокислотных последовательностей с известными аминокислотными последовательностями различных классов и подклассов иммуноглобулинов и определения класса и подкласса антител.

Термины «моноклональное антитело» или «композиция моноклонального антитела» относятся в данном описании к препарату молекул антител единого молекулярного состава. Композиция моноклонального антитела проявляет единственную специфичность связывания и аффинность в отношении конкретного эпитопа антигена.

Термин «антитело человека» включает в данном описании антитела, имеющие переменные области, в которых как каркасные, так и CDR-области получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если данное антитело содержит константную область, то константная область также получена из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека.

Антитела человека настоящего изобретения могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro*, или соматическая мутация *in vivo*). Однако термин «антитело человека», как использовано в данном описании, не включает антитела, в которых CDR-последовательности, полученные из зародышевой линии другого вида

млекопитающего, такого как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека.

Термин «моноклональное антитело человека» означает антитела, проявляющие единственную специфичность связывания, которые имеют переменные области, в которых как каркасные, так и CDR-области получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. В одном варианте осуществления моноклональные антитела человека получают с использованием гибридомы, которая включает в себя В-клетку, полученную из трансгенного животного (не человека), например, трансгенной мыши, имеющего геном, содержащий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи человека, слитые с иммортализованной клеткой.

Термин «рекомбинантное антитело человека», как использовано в данном описании, включает все антитела человека, которые были получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, например, (а) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным в отношении генов иммуноглобулина человека, или полученной из них гибридомы (описанной дополнительно ниже), (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела человека, например, из трансфектомы, (с) антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных, комбинаторных антител человека, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, включающим сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека в другие ДНК-последовательности. Такие рекомбинантные антитела человека имеют переменные области, в которых каркасные и CDR-области получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека могут быть подвергнуты *in vitro* мутагенезу (или, когда используют животное, трансгенное в отношении последовательностей Ig, соматическому мутагенезу), и, следовательно, аминокислотные последовательности областей VH и VL рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, хотя и получены из последовательностей VH и VL зародышевой линии человека или являются родственными указанным последовательностям, могут не существовать в природе в репертуаре зародышевой линии антител человека *in vivo*.

Фразы «антитело, распознающее антиген» и «антитело, специфическое в отношении антигена» являются в данном описании взаимозаменяемыми с термином «антитело, которое специфически связывается с антигеном».

«Вариант» антитела относится в данной заявке к молекуле, аминокислотная последовательность которой отличается от аминокислотной последовательности «родительского» антитела путем добавления, делеций и/или замещения одного или более аминокислотных остатков в последовательности родительского антитела. В предпочтительном из вариантов осуществления вариантное антитело содержит, по крайней мере, одну аминокислотную (например, от одной до десяти и предпочтительно 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8) инсерцию, делецию и/или замещение в CDR-участках родительского антитела. Идентичность или гомологичность относительно последовательности вариантного антитела определена в данной заявке как процент аминокислотных остатков в последовательности вариантного антитела, идентичный остаткам родительского антитела, после выравнивания последовательностей и введения разрывов, при необходимости, для достижения максимального процента идентичности последовательности. Вариантное антитело сохраняет способность связывать антиген или предпочтительно эпитоп, с которым связывается родительское антитело или

предпочтительно имеет, по крайней мере, одно свойство или биологическую активность, которая превосходит аналогичные свойства родительского антитела. Например, антитело предпочтительно обладает более сильной аффинностью связывания, большим периодом полувыведения, более низким IC50 или повышенной способностью

5 ингибировать биологическую активность антигена, чем родительское антитело. Вариантное антитело, представляющее особый интерес, в данной заявке является антителом, проявляющим, по крайней мере, приблизительно 2-кратное, предпочтительно, по крайней мере, приблизительно 5-кратное, 10-кратное или 20-кратное увеличение биологической активности по сравнению с родительским антителом.

10 Термин «идентичность» или «гомологичность» в контексте последовательностей нуклеиновых кислот, относится к остаткам в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании для максимального соответствия. Сравнение идентичности последовательности может проходить на участке длиной по меньшей мере около девяти нуклеотидов, обычно по меньшей мере около 18 нуклеотидов, чаще

15 по меньшей мере около 24 нуклеотида, типично по меньшей мере около 28 нуклеотидов, более типично по меньшей мере около 32 нуклеотидов, и предпочтительно по меньшей мере около 36, 48 или более нуклеотидов. Существует целый ряд различных алгоритмов, известных в данной области, которые могут быть использованы для измерения идентичности нуклеотидной последовательности. Например, полинуклеотидные

20 последовательности можно сравнить с использованием FASTA, Gap или BESTFIT, которые являются программами в Wisconsin Package версии 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Мэдисон, штат Висконсин. FASTA, которая включает, например, программы FASTA2 и FASTA3, обеспечивает выравнивание и процентную идентичность последовательности в областях наилучшего покрытия между запрашиваемой и искомой

25 последовательностями (Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol. 132: 185-219 (2000); Pearson, Methods Enzymol. 266: 227-258 (1996); Pearson, J. Mol. Biol. 276: 71-84 (1998)). Если не указано иное, используются параметры по умолчанию для конкретной программы или алгоритма. Например, процент идентичности последовательности между последовательностями нуклеиновых кислот может быть

30 определен с использованием FASTA с параметрами по умолчанию (размер слова 6 и фактора NOP AM для балльной матрицы) или с использованием Gap с параметрами по умолчанию, как это предусмотрено в GCG версии 6.1.

Термин «гомологичный», что касается полипептидной последовательности антитела, следует толковать как антитело, проявляющее по крайней мере 70%-ную,

35 предпочтительно 80%-ную, более предпочтительно 90%-ную и наиболее предпочтительно 95%-ную идентичность последовательности относительно полипептидной последовательности. Термин в отношении последовательности нуклеиновой кислоты следует толковать как последовательность нуклеотидов, проявляющих по крайней мере 85%-ную, предпочтительно 90%-ную, более

40 предпочтительно 95%-ную и наиболее предпочтительно 97%-ную идентичность последовательности относительно последовательности нуклеиновой кислоты.

«Родительское» антитело в данной заявке - это антитело, кодированное аминокислотной последовательностью, которая используется для получения варианта.

Антитела согласно изобретению могут быть получены различными методиками

45 конструирования, в том числе, с использованием рекомбинантных способов, включая шаффлинг ДНК, полученной из различных источников.

Термин «гуманизированное антитело» относится к антителам, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида

млекопитающего, такого как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека. В таких каркасных последовательностях человека могут быть произведены дополнительные модификации каркасной области.

Термин «химерное антитело» относится к антителам, в которых последовательности 5
 переменной области получены из одного вида, и последовательности константной области получены из другого вида, таким как антитело, в котором последовательности переменной области получены из мышиногo антитела, и последовательности константной области получены из антитела человека.

Термин «специфически связывает», как используется в данной заявке, относится к 10
 той ситуации, при которой один участник пары специфического связывания не связывает в значительной степени молекулы, отличные от его партнера (партнеров) по специфическому связыванию. Термин также применим, когда, например, антигенсвязывающий домен антитела по изобретению является специфическим для конкретного эпитопа, который переносится рядом антигенов, в таком случае 15
 специфическое антитело, имеющее антигенсвязывающий домен, будет способно к специфическому связыванию различных антигенов, несущих этот эпитоп.

Как использовано в данном описании, фраза антитело, которое «специфически связывается с PD-1 человека» относится к антителу, которое связывается с PD-1 человека 20
 с $KD\ 1 \times 10^{-7}M$ или менее, более предпочтительно $5 \times 10^{-8}M$ или менее, более предпочтительно $1 \times 10^{-8}M$ или менее, более предпочтительно $5 \times 10^{-9}M$ или менее.

Выражение «биспецифическое антитело» или «мультиспецифическое антитело» включает антитело, способное селективно связывать два или более эпитопа. Биспецифические антитела, например, могут включать два различных антиген- 25
 связывающих части, где указанные антиген-связывающие части специфически связывают разные эпитопы или на различных молекулах (например, антигенах), или на одной и той же молекуле (например, на одном и том же антигене). Если биспецифическое антитело способно селективно связывать два различных эпитопа (первый эпитоп и второй эпитоп), аффинность первой антиген-связывающих части для первого эпитопа, 30
 как правило будет по меньшей мере от одного до двух, или трех, или четырех порядков ниже, чем аффинность первой антиген-связывающих части для второго эпитопа, и наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифическим антителом, могут представлять собой одну и ту же или различную мишень (например, на одном и том же или различном белке). Биспецифические антитела можно получать, например, комбинированием 35
 тяжелых цепей, которые распознают различные эпитопы на одном и том же антигене. Например, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие переменные последовательности тяжелых цепей, которые распознают различные эпитопы, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими различные константные области тяжелой цепи, и такие последовательности можно экспрессировать 40
 в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина. Типичное биспецифическое антитело имеет две тяжелые цепи, где каждая имеет три CDR тяжелой цепи, с последующим (от N-конца до С-конца) доменом CH1, шарнирной областью, доменом CH2 и доменом CH3, и легкой цепью иммуноглобулина, которая или не наделена антигенсвязывающей специфичностью, но может объединяться с каждой из 45
 тяжелой цепей, или может объединяться с каждой из тяжелых цепей и может связывать один или несколько эпитопов, ограниченных антигенсвязывающими областями тяжелой цепи, или может объединяться с каждой из тяжелых цепей и способствует связыванию или одной или обеих тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами.

Выражения «биологическое свойство» или «биологическая характеристика» или

термины «активность» или «биоактивность» по отношению к антителу по изобретению используются в данной заявке как взаимозаменяемые и включают, но не ограничиваются приведенными, эпитоп/антигенную аффинность и специфичность, способность нейтрализовать или быть антагонистом активности PD-1 *in vivo* или *in vitro*, IC50, стабильность антитела и иммуногенные свойства антитела *in vivo*. Остальные идентифицируемые из уровня техники биологические свойства или характеристики антитела включают, например, перекрестную реактивность (т.е. с нечеловеческими гомологами пептида-мишени или с остальными протеинами или мишенями, в общем), и способность сохранять высокие уровни экспрессии белка в клетках млекопитающих. Вышеуказанные свойства или характеристики могут наблюдаться, измеряться или оцениваться с использованием методик, признанных в уровне техники, включая, но, не ограничиваясь приведенными, анализ ELISA, конкурентный анализ ELISA, анализ взаимодействия антиген-антитело методом поверхностного плазмонного резонанса на оборудовании BIACORE или KINEXA, или биослойной интерферометрии на оборудовании ForteBio, анализы нейтрализации *in vitro* или *in vivo* без ограничений, рецепторного связывания, продуцирования и/или секреции цитокина или фактора роста, сигнальную трансдукцию и иммуногистохимию срезов тканей, полученных из различных источников, включая человека, примата или любой другой источник.

Термин «ингибировать» или «нейтрализовать», как используется в данной заявке, по отношению к активности антитела по изобретению, означает способность в значительной степени противодействовать, препятствовать, предотвращать, ограничивать, замедлять, прерывать, уничтожать, прекращать, уменьшать или обращать, например, развитие или тяжесть того, что ингибируют, включая, но, не ограничиваясь, вышеприведенными, биологическую активность (например, активность PD-1) или свойство, заболевание или состояние. Ингибирование или нейтрализация активности PD-1 в результате связывания антитела по изобретению с PD-1 составляет предпочтительно, по крайней мере, приблизительно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% или выше.

PD1 связывающие молекулы

Настоящее изобретение относится связывающей молекуле, которая обладает способностью связываться с рецептором PD-1 человека, которые содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 75% гомологичную последовательности SEQ ID NO: 3, например, по крайней мере на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжелая цепь анти PD1 антитела (НС) по меньшей мере на 60% идентична последовательности SEQ ID NO: 1, например, не менее, чем на 60%, 70% или 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжелая цепь анти PD1 антитела (НС) по меньшей мере на 90% идентична последовательности на SEQ ID NO: 7, например, по меньшей мере на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 7. В отдельном варианте осуществления изобретения НС содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения легкая цепь анти PD1 антитела содержит аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи (L-CDR1) с номером SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи (L-CDR2) с номером SEQ ID NO: 5, аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи (L-CDR3) с номером SEQ ID NO: 6, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения легкая цепь PD1 антитела содержит аминокислотные

последовательности L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3 с номерами SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения легкая цепь анти PD1 антитела содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), который по меньшей мере на 60% идентичен последовательности SEQ ID NO: 8, например, по меньшей мере на 60%, 70% или 80% идентичен последовательности SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения легкая цепь анти PD1 антитела содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), который по меньшей мере на 90% идентичен последовательности SEQ ID NO: 8, например, по меньшей мере на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 8. В отдельном варианте осуществления изобретения VL-домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления изобретения легкая цепь анти PD1 антитела (LC) по меньшей мере на 60% идентична последовательности SEQ ID NO: 10, например, по меньшей мере на 60%, 70% или 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления изобретения легкая цепь PD1 антитела (LC) по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 10, например, по меньшей мере на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 10. В отдельном варианте осуществления изобретения VL-домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

Класс связывающей молекулы полученной способами, описанными в данном документе, может заменяться другим классом или подклассом. В одном из аспектов данного изобретения, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую VL или VH, выделяют с использованием способов, хорошо известных в данной области, так что она не включает последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих CL или CH. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие VL или VH, функционально соединили с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей CL или CH, соответственно, из другого класса молекулы иммуноглобулина. Это может быть достигнуто с использованием вектора или молекулы нуклеиновой кислоты, которая содержит CL или CH цепь, как описано выше. Например, связывающая молекула, которая изначально была IgM, может заменяться на класс IgG. Кроме того, замена класса может использоваться для конвертирования одного подкласса IgG в другой, например, из IgG1 в IgG2. Примерный способ получения связывающей молекулы, предложенной в данном изобретении, с желаемым изотипом, содержит этапы выделения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь связывающей молекулы и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь связывающей молекулы, получение вариабельного домена тяжелой цепи, лигирование вариабельного домена тяжелой цепи с константным доменом тяжелой цепи желаемого изотипа, выделение легкой цепи и лигированной тяжелой цепи в клетке, а также получение связывающей молекулы с желаемым изотипом.

Связывающая молекула по данному изобретению может представлять собой молекулу IgG, IgM, IgE, IgA или IgD, но, как правило, относится к изотипу IgG, например, IgG1, IgG2a, или b, IgG3 или IgG4 подкласса IgG. В одном варианте осуществления изобретения связывающая молекула представляет собой антитело IgG1 подкласса IgG.

В одном варианте осуществления изобретения связывающая молекула содержит Fc-участок по меньшей мере с одной мутацией. Известен ряд различных Fc мутаций, когда эти мутации обеспечивают изменение эффекторной функции. Например, во многих случаях будет желательно уменьшение или устранение эффекторной функции, например,

когда взаимодействие лиганда и рецептора является нежелательным или в случае конъюгатов антитела с лекарственным препаратом. Аминокислотные позиции Fc-участка, которые могут выгодно мутировать с целью снижения эффекторной функции, включают одну или более позиций 228, 233, 234 и 235, где позиции аминокислот пронумерованы в соответствии со схемой нумерации Kabat. В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающая молекула содержит Fc-участок по меньшей мере с одной мутацией, которая сокращает ADCC и/или CDC по сравнению с той же связывающей молекулой без мутации.

В определенных вариантах осуществления изобретения связывающая молекула по данному изобретению может быть частью более крупной иммуноадгезивной молекулы, образованной ковалентной или нековалентной ассоциацией антитела или части антитела с одним или более другими белками или пептидами. Примерами таких иммуноадгезивных молекул являются использование области ядра стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov et al. *Human Antibodies and Hybridomas* 6: 93-101 (1995)) и использование остатка цистеина, маркер-пептида и С-концевой полигистидиновой метки для получения бивалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov et al. *Mol. Immunol.* 31: 1047-1058 (1994)). Другие примеры включают примеры, где один или более CDR участков из антитела включены в молекулу ковалентно или нековалентно, чтобы получить иммуноадгезин, который специфично связывается с представляющим интерес антигеном. В таких вариантах осуществления изобретения CDR-участки могут быть включены как часть более крупной полипептидной цепи, могут ковалентно соединяться с другой полипептидной цепью или могут включаться нековалентно.

В другом варианте осуществления изобретения может быть получено слитое антитело или иммуноадгезин, который содержит всю или часть связывающей молекулы по данному изобретению, соединенную с другим полипептидом. В некоторых вариантах осуществления изобретения только переменные домены связывающей молекулы соединяются с полипептидом. В некоторых вариантах осуществления изобретения VH домен связывающей молекулы соединен с первым полипептидом, тогда как VL домен связывающей молекулы соединен со вторым полипептидом, который ассоциируется с первым полипептидом таким образом, что VH и VL домены могут взаимодействовать друг с другом с образованием антигенсвязывающего участка. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения VH домен отделен от VL домена линкером таким образом, что домены VH и VL могут взаимодействовать друг с другом (например, одноцепочечные антитела). Антитело VH-линкер-VL затем соединяется с представляющим интерес полипептидом. Кроме того, могут создаваться слитые антитела, в которых два (или более) одноцепочечных антитела соединены друг с другом. Это используется, если необходимо создать двухвалентное или поливалентное антитело на одной полипептидной цепи, или при создании мультиспецифичных антител.

Для создания одноцепочечного антитела (scFv) VH- и VL-кодирующие фрагменты ДНК функционально соединяются с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например кодирующим аминокислотную последовательность (Gly4-Ser)₃, так что последовательности VH и VL могут быть экспрессированы в виде непрерывного одноцепочечного белка с VL и VH доменами, соединенными гибким линкером. См., например, Bird et al. *Science* 242:423-426 (1988); Huston et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883 (1988); and McCafferty et al. *Nature* 348:552-554 (1990). Одноцепочечное антитело может быть одновалентным, если используется только один VH и VL домен; двухвалентным, если используются два VH и VL домена; или поливалентным, если

используются более чем два VH и VL домена.

Связывающую молекулу изобретения можно дериватизировать или соединить с другой молекулой (например, другим пептидом или белком). В целом, связывающие молекулы (например, антитела или антигенсвязывающие их части) дериватизируют таким образом, что дериватизация и мечение не оказывают неблагоприятного влияния на связывание с PD1. Таким образом, связывающие молекулы по данному изобретению могут включать как интактные, так и модифицированные формы связывающих молекул, описанных в настоящем документе. Например, связывающая молекула по данному изобретению может быть функционально соединена (путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или более молекулярными образованиями, такими как другое антитело, детектирующий агент, фармацевтический агент и/или белок или пептид, который может опосредовать ассоциацию связывающей молекулы с другой молекулой (такой как область ядра стрептавидина или полигистидиновая метка).

Один тип дериватизированной связывающей молекулы получают путем сшивания двух или более антител (одного и того же типа или различных типов, например, для создания биспецифичных антител). Подходящие сшивающие агенты включают те, которые являются гетеробифункциональными, имеющими две различные реактивные группы, разделенные подходящим спейсером (например, сложный эфир m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид) или гомобифункциональными (например, дисукцинимидил суберат).

Связывающая молекула по данному изобретению также может быть дериватизированна с химической группой, такой как полиэтиленгликоль (PEG), метильной или этильной группой, или углеводной группой. Эти группы могут использоваться для улучшения биологических характеристик связывающей молекулы, например, увеличение периода полувыведения в сыворотке крови.

Связывающая молекула изобретения также может быть меченой. Используемый в настоящем описании термин «метка» или «меченый» относится к встраиванию другой молекулы в связывающую молекулу. В одном варианте осуществления изобретения метка представляет собой детектируемый маркер, например, включение радиоактивной аминокислотной метки или присоединение к полипептиду биотиниловых фрагментов, которые могут быть обнаружены с помощью меченного авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которые могут быть детектируемы оптическими или колориметрическими способами).

В другом варианте осуществления изобретения метка или маркер может быть терапевтической, например, конъюгат с лекарственным препаратом или токсин. Различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов хорошо известны в данной области техники и могут быть использованы. Примеры меток для полипептидов включают, помимо прочего, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные метки (например, ФИТЦ, родамин, лантаноидов люминофоры), ферментные метки (например, пероксидазу хрена, β галактозидазы, люциферазы, щелочной фосфатазы), хемилуминесцентные маркеры, биотиниловые группы, предварительно определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, пары последовательностей лейциновой молнии, сайты связывания для вторичных антител, связывающих доменов металлов, эпитопные метки), магнитные агенты, такие как хелаты гадолиния, токсины, такие как коклюшный токсин, таксол, цитохалазин, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин,

доксорубицин, даунорубицин, дигидроксид антрацин дион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаина, лидокаин, пропранолол и пуромидин и их аналоги или гомологи. В некоторых вариантах осуществления изобретения метки прикреплены плечами спейсера различной длины для снижения потенциального стерического затруднения.

В определенных вариантах осуществления изобретения связывающие молекулы по данному изобретению, могут присутствовать в нейтральной форме (в том числе и цвиттер-ионных формах) или в форме как положительно, так и отрицательно заряженных частиц. В некоторых вариантах осуществления изобретения антители могут образовывать комплекс с противолионом с образованием фармацевтически приемлемой соли.

Термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к комплексу, содержащему одну или более связывающих молекул и один или более противоионов, полученных из фармацевтически приемлемых неорганических и органических кислот и оснований.

Фармацевтически приемлемые неорганические основания включают ионы металлов, включая, помимо прочего, подходящие соли щелочных металлов, соли щелочноземельных металлов и другие физиологические ионы приемлемых металлов. Соли, полученные из неорганических оснований, включают соли алюминия, аммония, кальция, кобальта, никеля, молибдена, ванадия марганца, хрома, селена, олова, меди, трехвалентного железа, лития, магния, марганцевые или марганцовистые соли, соли калия, рубидия, натрия и цинка, например, с их обычными валентностями.

Фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли связывающих молекул по настоящему изобретению могут быть получены из следующих кислот, включая, помимо прочего, муравьиную, уксусную, ацетамидобензойную, адипиновую, аскорбиновую, борную, пропионовую, бензойную, камфорную, угольную, цикламную, дегидрохолевую, малоновую, эдетовую (этилендиаминтетрауксусную), этилсерную, фендизойную (fendizoic), метафосфорную, янтарную, гликолевую, глюконовую, молочную, яблочную, винную, дубильную, лимонную, азотную, глюкуроновую, малеиновую, фолевую, фумаровую, пировиноградную, аспарагиновую, глутаминовую, соляную, бромистоводородную, иодистоводородную, лизин, изолимонную, трифторуксусную, памовую, анраниловую, метансульфоновую (mesylic), оротовую, щавелевую, щавелевоуксусную, олеиновую, стеариновую, салициловую, аминсалициловую, силикат, пара-гидроксibenзойную, никотиновую, фенилуксусную, миндальную, эмбоновую, сульфоновую, метансульфоновую, фосфорную, фосфоновую, этансульфоновую, этандисульфоновую, аммоний, бензолсульфоновую, пантотеновую, нафталинсульфоновую, толуолсульфоновую, 2-гидроксиэтансульфоновую, сульфаниловую, серную, азотную, азотистую, монометилловый сложный эфир серной кислоты, циклогексиламинсульфоновую, β -гидроксимасляную, глицин, глицилглицин, какодилловую, диаминокапроновую, камфорсульфоновую, тиоциановую, оксоглутаровую, пиридоксаль-5-фосфат, хлорфеноксиуксусную, ундекановую, N ацетил-L-аспарагиновую, галактаровую и галактуроновою кислоты.

Фармацевтически приемлемые органические основания включают триметиламин, диэтиламин, N,N'-дibenзилэтилендиамин, хлорпрокаин, холин, дбензиламин, диэтанолламин, этилендиамин, меглумин (N-метилглукамин), прокаин, циклические амины, четвертичные аммониевые катионы, аргинин, бетаин, кофеин, клемизол, 2-этиламиноэтанол, 2-диэтиламиноэтанол, 2-диметиламиноэтанол, этандиамин, бутиламин, этанолламин, этилендиамин, N-этилморфолин, N этилпиперидин, этилглукамин, глюкамин, глюкозамин, гистидин, гидрабамин, имидазол, изопропиламин,

метилглюкамин, морфолин, пиперазин, пиридин, пиридоксин, неоним, пиперидин, полиаминовые смолы, прокаин, пурины, теобромин, триэтиламин, трипропиламин, триэтаноламин, трометамин, метиламин, таурин, холат, 6-амино-2-метил-2-гептанол, 2-амино-2-метил-1,3-пропандиол, 2-амино-2-метил-1-пропанол, алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенил-замещенные алкановые кислоты, гидроксильные алкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты, стронций, трицин, гидразин, phenylcyclohexylamine, 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты, бис (2-гидроксиэтил) амино-трис (гидроксиметил) метана, N-(2-ацетамидо)-2-аминоэтансульфоновая кислота, 1,4-piperazinediethanesulfonic кислота, 3-морфолино-2-hydroxypropanesulfonic кислоты, 1,3-бис [трис(гидроксиметил) метиламино]пропан, 4-morpholinepropanesulfonic кислота, 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновой кислоты, 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновую кислоту 2-[(2-гидрокси-1,1-бис(гидроксиметил)этил)амино]этансульфоновую кислоту, N,N-бис (2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфоновую кислоту, 4-(N-морфолино)бутансульфоновую кислоту, 3-(N,N-бис[2-гидроксиэтил]амино)-2-гидроксипропансульфоновую кислоту, 2-гидрокси-3-[трис(гидроксиметил)метиламино]-1-пропансульфоновую кислоту, 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-(2-гидроксипропансульфоновую кислоту), пиперазин-1,4-бис(2-гидроксипропансульфоновую кислоту) дигидрат, 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинпропансульфоновую кислоту, N,N-бис(2-гидроксиэтил)глицин, N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(4-бутансульфоновую кислоту), N-[трис(гидроксиметил) метил]-3-аминопропансульфоновую кислоты, N-[трис(гидроксиметил)метил-4-аминобутансульфоновую кислоту, N-(1,1-диметил-2-гидроксиэтил)-3-амино-2-гидроксипропансульфоновую кислоту, 2-(циклогексиламино)этансульфоновую кислоту, 3-(циклогексиламино)-2-гидрокси-1-пропансульфоновую кислоту, 3-(циклогексиламино)-1-пропансульфоновую кислоту, N-(2-ацетамидо)иминодиуксусную кислоту, 4-(циклогексиламино)-1-бутансульфоновую кислоту, N-[трис(гидроксиметил)метил] глицин, 2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол и трометамол.

Молекулы нуклеиновых кислот и векторы

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, и последовательностям, кодирующим связывающие молекулы по данному изобретению, описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения различные молекулы нуклеиновых кислот кодируют первый домен и второй домен аминокислотной последовательности связывающей молекулы. Там, где первый домен и/или второй домен содержит тяжелую цепь и легкую цепь, в некоторых вариантах осуществления изобретения различные нуклеиновые кислоты кодируют тяжелую цепь и аминокислотные последовательности легкой цепи. В других вариантах осуществления изобретения та же молекула нуклеиновой кислоты кодирует последовательность тяжелой цепи и аминокислот легкой цепи. В определенных вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты может кодировать любую комбинацию из аминокислотных последовательностей (например, последовательности тяжелой и легкой цепи) первого и второго домена. В конкретном варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты может кодировать аминокислотную последовательность первого связывающего домена и аминокислотную последовательность легкой цепи второго связывающего домена, необязательно включающей любую последовательность соединяющего их пептидного линкера.

Ссылка на нуклеотидную последовательность, охватывает его комплимент, если не указано иное. Таким образом, ссылка на нуклеиновую кислоту, имеющую определенную последовательность следует понимать как охватывающие ее комплементарную цепь

с ее комплементарной последовательностью. Термин «полинуклеотид», упоминаемое в данном документе, означает полимерную форму нуклеотидов, по меньшей мере 10 оснований в длину, либо рибонуклеотидов, либо дезоксинуклеотидов или модифицированную форму любого типа нуклеотида. Термин включает в себя одно- и двухцепочечные формы.

Настоящее изобретение также относится к нуклеотидным последовательностям, которые по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичны одной или нескольким из вышеупомянутых нуклеотидных последовательностей или нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-10. В определенных вариантах осуществления нуклеотидные последовательности по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-9. Термин «процент идентичности последовательности» в контексте последовательностей нуклеиновых кислот, относится к остаткам в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании для максимального соответствия. Сравнение идентичности последовательности может проходить на участке длиной по меньшей мере около девяти нуклеотидов, обычно по меньшей мере около 18 нуклеотидов, чаще по меньшей мере около 24 нуклеотида, типично по меньшей мере около 28 нуклеотидов, более типично по меньшей мере около 32 нуклеотидов, и предпочтительно по меньшей мере около 36, 48 или более нуклеотидов. Существует целый ряд различных алгоритмов, известных в данной области, которые могут быть использованы для измерения идентичности нуклеотидной последовательности. Например, полинуклеотидные последовательности можно сравнить с использованием FASTA, Gap или BESTFIT, которые являются программами в Wisconsin Package версии 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Мэдисон, штат Висконсин. FASTA, которая включает, например, программы FASTA2 и FASTA3, обеспечивает выравнивание и процентную идентичность последовательности в областях наилучшего покрытия между запрашиваемой и искомой последовательностями (Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol. 132: 185-219 (2000); Pearson, Methods Enzymol. 266: 227-258 (1996); Pearson, J. Mol. Biol. 276: 71-84 (1998); включены в настоящий документ путем отсылки). Если не указано иное, используются параметры по умолчанию для конкретной программы или алгоритма. Например, процент идентичности последовательности между последовательностями нуклеиновых кислот может быть определен с использованием FASTA с параметрами по умолчанию (размер слова 6 и фактора NOP AM для балльной матрицы) или с использованием Gap с параметрами по умолчанию, как это предусмотрено в GCG версии 6.1, включенных в настоящий документ путем ссылки.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10. Молекула нуклеиновой кислоты может также содержать любую комбинацию указанных нуклеотидных последовательностей. В одном варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 4. В другом варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 4 и 6. В другом варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 4, 6

и 16. В другом варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 7. В другом варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 5.

5 В любом из указанных выше вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот могут быть выделенными.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к вектору, подходящему для экспрессии любой из нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе. Термин «вектор» при использовании в настоящем документе означает
10 молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она соединена. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой плазмиду, т.е. кольцевую двухцепочечную часть ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, в
15 котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. В некоторых вариантах осуществления изобретения векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный сайт инициации репликации и эписомные векторы млекопитающих). В других вариантах осуществления изобретения векторы (например,
20 неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и таким образом реплицируются вместе с геном хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально соединены. Такие векторы упоминаются в данном документе как «рекомбинантные экспрессирующие векторы» (или просто
25 «экспрессирующие векторы»).

Настоящее изобретение относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют любую из аминокислотных последовательностей связывающих молекул или их частей (например, последовательностей тяжелой и/или легкой цепи первого и/или второго связывающих доменов) как описано в настоящем
30 документе. Настоящее изобретение далее относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих слитые белки, модифицированные антитела, фрагменты антител и их зонды.

Молекула нуклеиновой кислоты по данному изобретению может быть выделена из любого источника, который продуцирует связывающую молекулу или ее часть. В
35 определенных вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты данному изобретению может быть синтезирована, а не выделена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты по данному изобретению может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую VH домен из первого или второго домена связывающей молекулы по
40 данному изобретению, соединенного в рамках считывания с нуклеотидной последовательности, кодирующей константный домен тяжелой цепи из любого источника. Аналогичным образом, молекула нуклеиновой кислоты по данному изобретению может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую VL домен из первой или второй области связывающей молекулы по данному изобретению,
45 объединенной в рамках считывания с нуклеотидной последовательностью, кодирующей константный домен легкой цепи из любого источника.

В еще одном аспекте настоящего изобретения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие переменный домен тяжелой (VH) и/или легкой (VL) цепей первого или

второго связывающего домена, могут «преобразовываться» по всей длине генов антитела. В одном варианте осуществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие домены VH или VL преобразуются в гены антитела по всей длине путем вставки в экспрессионный вектор, уже кодирующей константные домены тяжелой цепи (CH) или легкой цепи (CL), соответственно, так что VH сегмент функционально соединен с CH сегментом(-ами) в векторе и/или VL сегмент оперативно соединен с CL сегментом в векторе. В другом варианте осуществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие VH и/или VL домены преобразуются в гены по всей длине антитела путем соединения, например, лигирования, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей VH и/или VL домены, к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей CH и/или CL домены с использованием стандартных молекулярно-биологических методов. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие по всей длине тяжелую и/или легкую цепи, могут затем экспрессироваться из клетки, в которую они были введены.

Молекулы нуклеиновой кислоты могут использоваться для экспрессии большого количества рекомбинантных связывающих молекул. Молекулы нуклеиновой кислоты могут использоваться для получения человеческих антител, гуманизированных антител, химерных антител, биспецифических антител, одноцепочечных антител, иммуноадгезинов, диател, мутировавших антител и производных антител, как описано в настоящем документе.

В другом варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты по данному изобретению используется в качестве зонда или праймера ПЦР для определенной аминокислотной последовательности. Например, нуклеиновая кислота может быть использована в качестве зонда в способах диагностики или в качестве праймера ПЦР для амплификации участков ДНК, которые могут использоваться, например, для выделения дополнительных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих участки (например, вариабельные домены) связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот являются олигонуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды - из высоковариабельных доменов связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды кодируют все или часть одного или нескольких CDR-участков связывающей молекулы по данному изобретению, как описано в данном документе.

В другом варианте осуществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот и векторы могут быть использованы для изготовления мутировавших связывающих молекул. Антитела могут мутировать в вариабельных доменах тяжелой и/или легкой цепей первого и/или второго связывающего домена, например, для изменения связывающей способности связывающей молекулы. Например, мутация может произойти в одном или нескольких CDR-участках, чтобы увеличить или уменьшить KD связывающей молекулы, чтобы увеличить или уменьшить когтили изменить специфичность связывания антитела в отношении PD1. В другом варианте осуществления изобретения одной или более мутациям подвергнут аминокислотный остаток, который, как известно, изменен по сравнению с зародышевой линией в антителе, соответствующем первому или второму связывающему домену связывающей молекулы по данному изобретению. Эти мутации могут быть сделаны в CDR-участке или каркасном участке вариабельного домена, или в константном домене. В предпочтительном варианте осуществления изобретения мутации произведены в вариабельном домене. В другой варианте осуществления изобретения одной или несколькими мутациям подвергнут аминокислотный остаток, который, как известно, изменен по сравнению с зародышевой

линией в CDR-участке или каркасном участке вариабельного домена связывающей молекулы по данному изобретению.

В другой варианте осуществления изобретения каркасный участок(-и) мутирует таким образом, что полученный каркасный участок(-и) имеет аминокислотную последовательность соответствующего гена зародышевой линии. Мутации могут осуществляться в каркасном участке или константном домене, чтобы увеличить период полувыведения связывающей молекулы. См., например, WO 00/09560. Мутация в каркасном участке или константном домене также может быть произведена для изменения иммуногенности связывающей молекулы и/или обеспечить участок для ковалентного или нековалентного связывания с другой молекулой. В соответствии с изобретением связывающая молекула может иметь мутации в любом одном или нескольких из CDR-участков или каркасных участков вариабельного домена или в константном домене.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающие молекулы по данному изобретению экспрессируются путем вставки ДНК, кодирующей частично или полностью последовательность первого и второго связывающего домена (например, последовательности тяжелой и легкой цепи, где связывающий домен содержит последовательности тяжелой и легкой цепи), полученный, как описано выше, в экспрессионных векторах таким образом, что гены функционально соединены с необходимыми последовательностями, контролирующими экспрессию, такими как транскрипционные и трансляционные контрольные последовательности. Экспрессионные векторы включают плазмиды, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), вирусы растений, такие как вирус мозаики цветной капусты, вирусы табачной мозаики, космиды, YAC, EBV полученные эписомы и тому подобное. Молекулы ДНК могут быть лигированы в вектор таким образом, что последовательности, контролирующие транскрипцию и трансляцию в векторе, выполняют предусмотренную функцию регуляции транскрипции и трансляции ДНК. Экспрессионный вектор и последовательности контроля экспрессии могут быть выбраны таким образом, чтобы быть совместимыми с используемой экспрессирующей клеткой-хозяином. Молекулы ДНК, кодирующие частично или по всей длине последовательности первого и второго связывающих доменов (например, последовательности тяжелой и легкой цепи, где связывающий домен содержит последовательность тяжелой и легкой цепи) могут быть введены в отдельные векторы. В одном варианте осуществления изобретения любая комбинация указанных выше молекул ДНК вводится в тот же экспрессионный вектор. Молекулы ДНК могут быть введены в экспрессионный вектор стандартными способами (например, лигированием комплементарных сайтов рестрикции на фрагменте гена антигена и вектора или лигированием тупых концов, если сайты рестрикции отсутствуют).

Подходящим вектором является тот, который кодирует функционально законченные последовательности СН или СL человеческого иммуноглобулина с конструированием соответствующего места рестрикции так, что любая последовательность VH или VL может быть легко включена и экспрессирована, как описано выше. HC - и LC-кодирование генов в таких векторах может содержать интронные последовательности, что приводит к общему увеличению белковых продуктов антигена путем стабилизации соответствующей мРНК. Интронные последовательности находится в окружении сплайс-донора и сплайс-акцептора сайтов, которые определяют, где будет происходить сплайсинг РНК. Расположение интронных последовательностей может быть либо в вариабельных или константных участках цепей антигена, или как в вариабельных, так

и константных участках, когда используются несколько интронов. Прекращение полиаденилирования и транскрипции может произойти вниз по ходу сайта нативной хромосомы кодируемых участков. Рекомбинантный экспрессионный вектор также может кодировать сигнальный пептид, который облегчает выработку цепочки антитела клеткой-хозяином. Ген цепочки антитела может быть клонирован в вектор таким образом, что сигнальный пептид соединен с рамкой считывания аминоконца цепи иммуноглобулина. Сигнальным пептидом может быть сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (то есть, сигнальный пептид белка не иммуноглобулиновой природы).

Помимо цепочки генов антител, рекомбинантная экспрессия векторов по данному изобретению может нести регулирующие последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепи антител в клетке-хозяине. Специалистам в этой области будет понятно, что дизайн экспрессионного вектора, включая выбор регулирующих последовательностей, может зависеть от таких факторов, как селекция клетки-хозяина для трансформации, уровень экспрессии желаемого белка, и т.д. Предпочтительные регулирующие последовательности для экспрессирующей клетки-хозяина млекопитающих включают вирусные элементы, обеспечивающие высокий уровень экспрессии белков в клетках млекопитающих, таких как промотеры и/или энхансеры полученные из ретровирусной LTR, цитомегаловируса (CMV) (например, CMV промотера/энхансера), обезьяньего вируса 40 (SV40) (например, SV40 промотера/энхансера), аденовируса, (например, аденовирус большого позднего промотера (AdMLP)), вирус полиомы, а также сильных промотеров млекопитающих, таких как нативный иммуноглобулин и актин промотеров. Для дальнейшего описания вирусных регулирующих элементов и их последовательностей см., например, патенты США 5,168,062, 4,510,245 и 4,968,615. Способы экспрессии связывающих молекул, таких как антитела растений, в том числе описание промотеров и векторов, а также трансформация растений, известны в данной области техники. См., например, патент США 6,517,529. Методы экспрессии полипептидов в бактериальных клетках или клетках грибов, например, дрожжевых клетках, также хорошо известны в данной области техники.

В дополнение к генам цепи антитела и регулирующим последовательностям, рекомбинантные векторы экспрессии изобретения могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и гены селектируемого маркера. Ген селектируемого маркера облегчает селекцию клеток-хозяев, в которые был введен вектор (см., например, патенты США 4,399,216, 4,634,665 и 5,179,017). Например, обычно ген селектируемого маркера придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую вектор введен. Например, гены селектируемого маркера включают ген дигидрофолат редуктазы (DHFR) (для использования в dhfr-клетках-хозяевах при селекции/амплификации метотрексата), ген нео (для селекции G418) и ген синтетазы глутамата.

Термин «последовательность контроля экспрессии», используемый в данном описании, означает полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для воздействия на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, к которым они лигированы. Контролирующие экспрессию последовательности включают соответствующие последовательности инициации транскрипции, терминации, промотера и энхансера; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сплайсинг и сигналы полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е.

консенсусная последовательность Козака); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при желании, последовательности, которые усиливают секрецию белка. Характер таких контролирующих последовательностей различается в зависимости от организма-хозяина; в прокариотах такие контролирующие последовательности, как правило, включают промотор рибосомального сайта связывания, а также последовательности терминации транскрипции; в эукариотах, как правило, такие контролирующие последовательности включают промотеры и последовательности терминации транскрипции. Термин «контролирующие последовательности» включает, как минимум, все компоненты, наличие которых имеет важное значение для экспрессии и процессинга, и может также включать дополнительные компоненты, чье присутствие является полезным, например, лидирующие последовательности и последовательности слившихся клеток.

Клетки-хозяева и способ получения связывающей молекулы

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к способам получения связывающих молекул по данному изобретению. Один вариант осуществления изобретения относится к способу получения связывающих молекул, как определено в настоящем документе, содержащему введение рекомбинантной клетки-хозяина, способной экспрессировать связывающую молекулу, культивацию указанной клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии связывающей молекулы, и выделение полученной связывающей молекулы. Связывающие молекулы, полученные такой экспрессией в таких рекомбинантных клетках-хозяевах упоминаются в данном документе как «рекомбинантные связывающие молекулы.» Там, где связывающие молекулы являются антителами, они называются «рекомбинантными антителами». Изобретение также относится к потомству клеток таких клеток-хозяев и связывающих молекул получаемых аналогично.

Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин») при использовании в данном документе означает клетку, в которую введен рекомбинантный экспрессионный вектор. Настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, которые могут включать, например, вектор в соответствии с настоящим изобретением, описанным выше. Настоящее изобретение относится также к клеткам-хозяевам, которые включают, например, нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающие части, нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или ее антигенсвязывающие части, или обе из них, первого связывающего домена и/или второго связывающего домена связывающей молекулы по данному изобретению. Следует понимать, что «рекомбинантная клетка-хозяин» и «клетка-хозяин» означают не только конкретную заявленную клетку, но также и потомство такой клетки. Поскольку модификации могут проходить в последующих поколениях вследствие мутации или воздействий окружающей среды, такое потомство не может, на самом деле, быть идентичным родительской клетке, но такие клетки по-прежнему включены в объем термина «клетка-хозяин» при использовании в настоящем документе.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие связывающие молекулы по изобретению и векторы, содержащие эти молекулы нуклеиновой кислоты, могут быть использованы для трансфекции подходящего млекопитающего, растения, бактериальной или дрожжевой клетки-хозяина. Преобразование может происходить любым известным способом для введения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают декстран-опосредованную трансфекцию, осаждение фосфата кальция, полибрен-опосредованную трансфекцию, слияние протопластов, инкапсуляцию

полинуклеотида(-ов) в липосомы и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. В дополнение, молекулы нуклеиновых кислот могут быть введены в клетки млекопитающих вирусными векторами. Способы трансформации клеток хорошо известны в данной области техники. См., например, патенты США, 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461 и 4,959,455. Способы трансформации клеток растений хорошо известны в данной области, включая, например, *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию, биолистическую трансформацию, прямую инъекцию, электропорацию и вирусную трансформацию. Методы трансформации клеток бактерий и дрожжей также хорошо известны в данной области.

Клеточные линии млекопитающих используемые в качестве хозяев для трансформации, хорошо известны в данной области и включают множество иммортализованных клеточных линий доступных в Американской коллекции типовых культур (ATCC). К ним относятся, в частности, клетки яичников китайского хомячка (CHO), NS0 клетки, клетки SP2, НЕК-293Т клетки, 293 Фристайл клетки (Invitrogen), NIH-3T3 клетки, клетки HeLa, клетки почек хомячка (ВНК), клетки почек африканских зеленых мартышек (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Нер G2), A549 клетки и ряд других клеточных линий. Клеточные линии особого предпочтения выбираются путем определения, какие клеточные линии имеют высокие уровни экспрессии. Другими клеточными линиями, которые могут быть использованы, являются клеточные линии насекомых, такие как Sf9 или Sf21 клетки. Когда векторы рекомбинантной экспрессии, кодирующих связывающие молекулы, вводятся в клетки-хозяева млекопитающих, связывающие молекулы продуцируются путем культивирования клеток-хозяев в течение времени, достаточного для экспрессии связывающей молекулы в клетках-хозяевах или предпочтительнее выделения связывающей молекулы в питательной среде, в которой выращиваются клетки-хозяева. Связывающие молекулы могут быть восстановлены из питательной среды с использованием стандартных методов очистки белка. Клетки-хозяева растений, например, включают *Nicotiana*, *Arabidopsis*, ряску, кукурузу, пшеницу, картофель и т.д. Клетки бактерий хозяина включают виды *E. coli* и *Streptomyces*. Дрожжевые клетки-хозяева включают *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

Кроме того, экспрессию связывающих молекул по данному изобретению из продуцирующей клеточной линии можно усилить с помощью ряда известных методов. Например, система экспрессии гена глутамин синтетазы (система GS) является достаточно распространенной для усиления экспрессии при определенных условиях. Система GS обсуждается в целом или частично в связи с патентами EP 0216846, 0256055, 0323997 и 0338841.

Вполне вероятно, что связывающие молекулы различных клеточных линий или трансгенные животные будут отличаться друг от друга профилем гликозилирования. Однако все связывающие молекулы, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, описанными в данном документе, или содержащими аминокислотные последовательности, приведенные в настоящем документе, являются частью данного изобретения, независимо от состояния гликозилирования связывающих молекул и в целом, независимо от наличия или отсутствия пост-трансляционных модификаций.

Связывающие молекулы могут изготавливаться с использованием различных способов. Например, домены, связывающиеся с PD1, могут быть приготовлены отдельно (например, с помощью химического белкового синтеза, способами рекомбинантной экспрессии, гибридной технологии, и т.д.) и затем химически прикреплены друг к другу, непосредственно или с помощью линкера. Средства химической конъюгации молекул (например, антител или их антигенсвязывающих частей) хорошо известны в

этой области. Полипептиды, как правило, содержат целый ряд функциональных групп; например, карбоновая кислота (COOH) или безаминные (-NH₂) группы, способные реагировать с подходящими функциональными группами соответствующего полипептида или линкера. Антитела могут также быть дериватизированы для взаимодействия или присоединения дополнительных функциональных групп и могут включать прикрепление одной или нескольких молекул линкера, таких как те, что предлагаются Pierce Chemical Company, Rockford 111. Линкеры, используемые в связывающих молекулах по данному изобретению, могут быть любыми из различных подходящих линкеров, известных в этой области.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывание доменов с PD1 производится путем экспрессии рекомбинантных антител или их антигенсвязывающих частей в клетках-хозяевах. Последовательности, кодирующие любую комбинацию связывающих доменов, могут быть соединены (напрямую или через линкер). Полученные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие домены, связывающиеся с PD1, вставляют в экспрессионные векторы и вводят в клетки-хозяев. Полученные связывающие молекулы затем экспрессируются, изолируются и очищаются от системы экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающие домены связывающей молекулы могут быть спарены вместе посредством инновационной молекулой линкера, предназначенной для защиты от протеолитической дегградации связывающей молекулы. Такой линкер обычно лишен сайта протеолитического расщепления.

Как используется в данной заявке, выражения «клетка», «клетка-хозяин», «линия клеток» и «клеточная культура», «клеточная линия как продуцент» используются как взаимозаменяемые и включают индивидуальную клетку или клеточную культуру, являющиеся реципиентом любого выделенного полинуклеотида по изобретению или любого рекомбинантного вектора (любых рекомбинантных векторов), которые содержат последовательность, кодирующую HCVR, LCVR или моноклональное антитело по изобретению. Клетки-хозяева включают потомство индивидуальной клетки-хозяина, и потомство может не обязательно быть полностью идентичным (по морфологии или полному ДНК комплементу) оригинальной родительской клетке из-за природных, случайных или преднамеренных мутаций и/или изменений. Клетка-хозяин включает клетки, трансформированные, трансдуцированные или инфицированные рекомбинантным вектором, или моноклональное антитело, которое экспрессирует полинуклеотид по изобретению или его легкую или тяжелую цепь. Клетка-хозяин, которая содержит рекомбинантный вектор по изобретению (как стабильно включенный в хромосомы хозяина, так и не включенный), также может называться «рекомбинантной клеткой-хозяином». Предпочтительными клетками-хозяевами для использования в изобретении являются CHO клетки (например, ATCC CRL-9096), NS0 клетки, SP2/0 клетки, COS клетки (ATCC, например, CRL-1650, CRL-1651) и HeLa (ATCC CCL-2). Дополнительные клетки-хозяева для использования в изобретении включают растительные клетки, дрожжевые клетки, другие клетки млекопитающих и прокариотные клетки.

Фармацевтическая композиция

Термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции и/или составу, содержащему антитело согласно изобретению, в терапевтически эффективном количестве и вспомогательные вещества (эксципиенты, разбавители, наполнители, растворители и вспомогательные вещества).

Термин «эксципиент» используется в данном документе для описания любого

ингредиента, отличающегося от соединения(-ий) по данному изобретению. Выбор инертного наполнителя будет в значительной степени зависеть от таких факторов, как конкретный способ введения, действие наполнителя на растворимость и стабильность и характер лекарственной формы. При использовании в данном документе

5 «фармацевтически приемлемый наполнитель» включает все без исключения растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и подобные физиологически совместимые вещества. Некоторыми примерами фармацевтически приемлемых наполнителей являются вода, физиологический раствор, фосфатный буфер, декстроза, 10 глицерин, этанол и т.п., а также их комбинации. Во многих случаях будет предпочтительным включить в композицию изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннитол, сорбит, или хлорид натрия. Дополнительными примерами фармацевтически приемлемых веществ являются увлажняющие агенты или небольшое количество вспомогательных веществ, таких как увлажняющие или 15 эмульгирующие вещества, консерванты или буферы, которые увеличивают продолжительность хранения или эффективность антителя.

Антитело по изобретению может быть включено в фармацевтическую композицию, пригодную для введения пациенту (см. Пример 17). Антитела по изобретению могут быть введены отдельно или в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, 20 разбавителем и/или наполнителем в однократных или многократных дозах. Фармацевтические композиции для введения разработаны таким образом, чтобы соответствовать выбранному режиму введения, а фармацевтически приемлемые разбавители, носители и/или наполнители, такие как диспергирующие агенты, буфера, поверхностноактивные вещества, консерванты, солюбилизующие агенты, 25 изотонические агенты, стабилизаторы и т.п. использованы должным образом (см. Пример 17). Указанные композиции разработаны в соответствии с традиционными методами, приведенными в, например, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995, где описаны различные методы получения композиций, в общем известных специалистам.

30 Фармацевтическая композиция, содержащая анти-PD-1 моноклональное антитело по изобретению, может быть введена пациенту, имеющему риск развития или имеющему патологии, как описано в данной заявке, с использованием стандартных методов введения, включая пероральное, внутривенное, интраперитонеальное, подкожное, легочное, трансдермальное, внутримышечное, интраназальное, буккальное, 35 сублингвальное или при помощи суппозиториев.

Фармацевтическая композиция по изобретению предпочтительно содержит или является «терапевтически эффективным количеством» антителя по изобретению. «Терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному при дозировках и на протяжении периодов времени, необходимого для достижения 40 желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество антителя может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и вес индивидуума, и способности антителя или части антителя вызывать желательную реакцию у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при котором терапевтически полезный эффект антителя 45 преобладает над токсическим или вредным эффектом. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному при дозировках и на протяжении периодов времени, необходимых для достижения желательного профилактического результата. Поскольку профилактическую дозу используют для индивидуумов до или

на ранней стадии заболевания, то, типично, профилактически эффективное количество может быть меньшим, чем терапевтически эффективное количество.

Терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество представляет собой, по крайней мере, минимальную дозу, но меньшую, чем токсическая доза активного агента, необходимую для обеспечения терапевтической пользы пациенту. С другой стороны, терапевтически эффективное количество антитела по изобретению представляет собой количество, которое у млекопитающих, предпочтительно людей, снижает биологическую активность PD-1.

Путь введения антитела по изобретению может быть пероральным, парентеральным, путем ингаляции или местным. Предпочтительно антитела по изобретению могут быть включены в фармацевтическую композицию, пригодную для парентерального введения. Термин «парентеральный», как используется в данной заявке, включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное или интраперитонеальное введение. Преимущественным является введение путем внутривенной или интраперитонеальной, или подкожной инъекции. Подходящие носители для таких инъекций непосредственно известны из уровня техники.

Фармацевтическая композиция, как указано в соответствующих руководствах, должна быть стерильной и стабильной в условиях производства и хранения в контейнере, который обеспечивается, включая, например, герметично закрытый флакон (ампула) или шприц. Поэтому фармацевтические композиции могут быть стерильно профильтрованными после получения состава либо сделаны микробиологически пригодными иным образом. Типичная композиция для внутривенной инфузии может иметь объем в 250-1000 мл жидкости, такой как стерильный раствор Рингера, физиологический раствор, раствор декстрозы и раствор Хенка, и терапевтически эффективную дозу (например, 1-100 мг/мл или более) концентрации антитела. Доза может варьировать в зависимости от вида и тяжести заболевания. Как хорошо известно из уровня техники в области медицины, дозировки для любого из пациентов зависят от многих факторов, включая размеры пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное соединение, предназначенное для введения, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие лекарства, которые вводят одновременно. Типичная доза может находиться, например, в диапазоне 0,001-1000 мкг; однако, предвидятся дозы, находящиеся ниже или выше этого иллюстративного диапазона, особенно учитывая вышеуказанные факторы. Режим дозирования ежедневного парентерального введения может составлять от 0,1 мкг/кг до 100 мг/кг от общей массы тела, предпочтительно от 0,3 мкг/кг до 10 мг/кг и более предпочтительно от 1 мкг/кг до 1 мг/кг, даже более предпочтительно от 0,5 до 10 мг/кг массы тела в день. Процесс лечения можно контролировать путем периодической оценки состояния пациента. Для повторного введения в течение нескольких дней или дольше в зависимости от состояния пациента лечение повторяют до достижения желаемого ответа или подавления симптомов болезни. Однако также могут применяться другие режимы дозирования, которые не описаны в данной заявке. Желаемая дозировка может быть введена путем однократного введения, множественных болюсных введений или путем непрерывного инфузионного введения антитела в зависимости от образца фармакокинетического распада, которого хочет достигнуть практикующий специалист.

Эти предположительные количества антитела в сильной степени зависят от решения врача. Ключевым фактором выбора соответствующей дозы и режима является желаемый результат. Факторы, рассматриваемые в данном контексте, включают конкретное заболевание, которое лечат, конкретное млекопитающее, которое лечат, клиническое

состояние отдельного пациента, причину расстройства, место введения антитела, конкретный вид антитела, способ введения, режим введения и остальные факторы, известные практикующим специалистам-медикам.

Терапевтические агенты по изобретению могут быть заморожены либо
 5 лиофилизированы и восстановлены перед применением в подходящем стерильном носителе. Лيوфилизирование и восстановление могут приводить к различным степеням потери активности антитела. Дозировки могут быть скорректированы для компенсации этой потери. В общем случае, преимущественными являются значения pH фармацевтической композиции от 6 до 8.

10 Терапевтическое применение связывающей молекулы по данному изобретению

В одном аспекте связывающая молекула по данному изобретению применяется в лечении нарушений, которые связаны с активностью PD1.

«Лечить», «лечение» и «терапия» относятся к методу смягчения или устранения биологического расстройства и/или по меньшей мере одного из сопутствующих ему
 15 симптомов. Используемый в данном документе, чтобы «облегчить» болезнь, заболевание или состояние, означает уменьшение тяжести и/или частоты возникновения симптомов заболевания, расстройства или состояния. Кроме того, содержащиеся в данном документе ссылки на «лечение» включают ссылки на лечебную, паллиативную и профилактическую терапию.

20 В одном аспекте субъект лечения или пациент является млекопитающим, предпочтительно человеческим субъектом. Вышеупомянутый субъект может быть мужского или женского возраста пола любого возраста.

«Терапевтически эффективным количеством» считается количество вводимого в процессе лечения терапевтического агента, которое избавит в определенной степени
 25 от одного или нескольких симптомов заболевания, по поводу которого проводится лечение.

Связывающие молекулы по данному изобретению могут назначаться отдельно или в сочетании с одним или более другими препаратами или антителами (или в любой их комбинации). Таким образом, фармацевтические композиции, способы и использование
 30 изобретения также охватывает варианты осуществления комбинаций (совместное назначение) с другими активными агентами, как описано далее.

Используемые в данном документе термины «совместное назначение», «совместно назначенный» и «в сочетании с» относящиеся к связывающим молекулам с одним или более другими терапевтическими агентами, как предполагается, означают, ссылаются
 35 или включают:

одновременное введение такой комбинации связывающей молекулы по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы вместе в одной лекарственной форме, из которой указанные компоненты высвобождаются практически одновременно указанному
 40 пациенту,

одновременное введение такой комбинации связывающей молекулы по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы отдельно в разных лекарственных формах, введение которых происходит практически в одно и то же время указанному пациенту, после
 45 чего указанные компоненты высвобождаются практически одновременно указанному пациенту,

последовательное введение такой комбинации связывающей молекулы по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда

такие компоненты сформулированы отдельно друг от друга в отдельных лекарственных формах, которые принимаются в последовательно по времени указанным пациентом со значимым временным интервалом между каждым введением, после чего указанные компоненты высвобождаются в практически разное время указанному пациенту; а

также

последовательное введение такой комбинации связывающей молекулы по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы вместе в единый лекарственной форме, из которой высвобождение указанных компонентов происходит контролируемым образом, после чего они одновременно, последовательно или совместно высвобождаются в одно и то же время и/или разное время указанному пациенту, где каждая часть может быть введена одним или разными путями.

Связывающие молекулы по данному изобретению могут назначаться без дополнительного терапевтического лечения, т.е. в качестве самостоятельной терапии.

Кроме того, лечение связывающими молекулами по данному изобретению может включать по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое лечение (комбинированная терапия). В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающая молекула может вводиться совместно или быть сформулирована с другим медикаментом/препаратом для лечения аутоиммунного или воспалительного

заболевания. Фармацевтические препараты, содержащие связывающую молекулу по данному изобретению и по меньшей мере один другой агент (например, иммуносупрессивный или противовоспалительный агент), могут применяться в качестве комбинированной терапии для одновременного, раздельного или последовательного введения в лечение воспалительных и аутоиммунных расстройств.

Подразумевается, что связывающие молекулы по данному изобретению могут использоваться в способах лечения, как описано выше, могут использоваться в лечении, как описано выше, и/или могут использоваться в производстве медикаментов для лечения, как описано выше.

Дозы и пути введения

Любой способ введения пептидов, белков или антител, принятый в данной области, может соответствующим образом использоваться для связывающей молекулы по данному изобретению.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, как правило, пригодны для парентерального введения. Используемый в данном документе термин «парентеральное введение» фармацевтической композиции включает любой способ введения, для которого характерно физическое нарушение целостности ткани субъекта и введение фармацевтической композиции через нарушение в ткани, что обычно приводит к прямому попаданию в кровоток, в мышцу или во внутренний орган. Таким образом, парентеральное введение включает, помимо прочего, введение фармацевтической композиции путем инъекции композиции посредством введения композиции через хирургический разрез, путем нанесения композиции с помощью проникающей в ткани нехирургической раны и т.п. В частности, предполагается, что парентеральное введение включает, помимо прочего, подкожную, внутрибрюшинную, внутримышечную, внутривенную, внутриартериальную, интратекальную, внутрижелудочковую, интрауретральную, внутричерепную, внутрисуставную инъекцию или инфузии; и почечные диализные инфузионные методики. Внутриопухолевая доставка, например, внутриопухолевая инъекция, также может оказаться полезной. Также

предусмотрена региональная перфузия. Предпочтительные варианты осуществления изобретения включают внутривенный и подкожный пути.

Лекарственные формы фармацевтических композиций, подходящие для парентерального введения, обычно содержат активный ингредиент в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, например, стерильной водой или стерильным изотоническим раствором. Такие лекарственные формы могут быть изготовлены, упакованы или проданы в форме, подходящей для болюсного введения или для непрерывного введения. Инъекционные лекарственные формы могут быть изготовлены, упакованы или проданы в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах, или в многодозовых контейнерах, содержащих консервант. Лекарственные формы для парентерального введения включают, помимо прочего, суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных основах, пасты и тому подобное. Такие лекарственные формы могут также содержать один или более дополнительных ингредиентов, включая, помимо прочего, суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие агенты. В одном варианте осуществления изобретения композиции для парентерального введения активный ингредиент предоставляется в сухой форме (то есть, порошок или гранулы) для растворения с подходящей основой (например, стерильная апиrogenная вода) до парентерального введения восстановленного состава. Парентеральные лекарственные формы и также включают водные растворы, которые могут содержать наполнители, такие как соли, углеводы и буферные агенты (предпочтительно до pH от 3 до 9), но для некоторых видов применения более подходящей лекарственной формой может являться стерильный неводный раствор или сухая форма для использования в сочетании с подходящей основой, такой как стерильная апиrogenная вода. Примером формы для парентерального введения являются растворы или взвеси в стерильных водных растворах, например, водные растворы пропиленгликоля или декстрозы. Такие лекарственные формы при необходимости могут быть буферными. Другие подходящие лекарственные формы для парентерального введения могут включать те, которые содержат активный ингредиент в микрокристаллической форме или в липосомальном препарате. Лекарственные формы для парентерального введения могут быть выполнены для немедленного и/или модифицированного высвобождения. Лекарственные формы с модифицированным высвобождением включают отсроченное, замедленное, пульсирующее, контролируемое, нацеленное и программируемое высвобождение.

Например, в одном из аспектов стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения по меньшей мере одного связывающей молекулы в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей фильтрационной стерилизацией. Обычно дисперсии получают введением активного соединения в стерильный растворитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов, способы получения представляют собой сушку вымораживанием (лиофилизацию), которая дает порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желательный ингредиент из его предварительно стерилизованного фильтрацией раствора. Надлежащая текучесть раствора может поддерживаться, например, применением материалов покрытия, таких как лецитин, поддержанием необходимого размера частиц в случае дисперсий и применением поверхностно-активных веществ. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть осуществлено путем включения в композицию агента, который задерживает абсорбцию, например, моностеараты и желатин, и/или

путем покрытий с модифицированным высвобождением (например, покрытий с медленным высвобождением).

Связывающие молекулы по данному изобретению могут также вводиться интраназально или ингаляционно, обычно в форме сухого порошка (самостоятельно, в виде смеси или в виде частиц со смешанными компонентами, например, смешанными с подходящим фармацевтически приемлемым наполнителем) из ингалятора с сухим порошком, такого как аэрозольный контейнер под давлением, помпа, спрей, распылитель (предпочтительно распылитель, в котором использован принцип электрогидродинамики для получения мелкодисперсного тумана) или небулайзер, в котором используется или не используется подходящий пропеллент, или в виде назальных капель.

Контейнер под давлением, помпа, спрей, распылитель или небулайзер обычно содержит раствор или суспензию связывающей молекулы по данному изобретению, включая, например, подходящее вещество для диспергирования, растворения или продления высвобождения активного вещества, пропеллент в качестве растворителя.

До использования в виде сухого порошка или суспензии, лекарственный препарат обычно микронизируют до размера, подходящего для доставки путем ингаляции (обычно менее 5 микрон). Этого можно достичь любым подходящим способом измельчения, таким как размол на спиральной струйной мельнице, размол на струйной мельнице с кипящим слоем, сверхкритическая очистка жидкости для формирования наночастиц, гомогенизация высоким давлением или распылительная сушка.

Капсулы, блистеры и картриджи для использования в ингаляторе или инсуфляторе могут быть выполнены так, чтобы содержать порошковую смесь соединения по данному изобретению, подходящей порошковой основы и модификатор активности.

Подходящая формула раствора для использования в распылителе, в котором использован принцип электрогидродинамики для получения мелкодисперсного тумана, может содержать подходящую дозу связывающей молекулы по данному изобретению на одно нажатие, и объем на нажатие может варьироваться, например, от 1 мкл до 100 мкл.

В лекарственные формы по данному изобретению, предназначенные для ингаляции/интраназального введения, могут быть добавлены подходящие ароматизаторы, такие как ментол и левоментол, или подсластители, такие как сахарин или натрия сахарин.

Лекарственные формы для парентерального введения могут быть выполнены для немедленного и/или модифицированного высвобождения. Лекарственные формы с модифицированным высвобождением включают отсроченное, замедленное, пульсирующее, контролируемое, нацеленное и программируемое высвобождение.

В случае порошковых ингаляторов и аэрозолей, единица дозирования устанавливается посредством клапана, который доставляет отмеренное количество. Единицы в соответствии с данным изобретением обычно устанавливают для введения отмеренной дозы или «впрыска» связывающей молекулы по данному изобретению. Общая суточная доза будет обычно вводиться в виде однократной дозы или еще чаще - в виде разделенных доз в течение суток.

Связывающие молекулы по данному изобретению также могут быть выполнены в лекарственной форме для перорального введения. Пероральное введение может включать глотание, так что соединение поступает в желудочно-кишечный тракт и/или буккально, лингвально или сублингвально поступает в кровоток непосредственно из полости рта.

Лекарственные формы, пригодные для перорального введения, включают твердые,

полутвердые и жидкие системы, такие как таблетки; мягкие или твердые капсулы, содержащие мульти- или наночастицы, жидкости или порошки; пастилки (включая заполненные жидкостью); жевательные формы; гели; быстро растворимые лекарственные формы; пленки; суппозитории; спреи; и щечные/мукоадгезивные пластыри.

Жидкие лекарственные формы включают суспензии, растворы, сиропы и эликсиры. Такие лекарственные формы могут быть использованы как наполнители в мягких или жестких капсулах (например, из желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы) и обычно содержат носитель, например, воду, этанол, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, метилцеллюлозу или подходящее масло и один или более эмульгаторов и/или суспендирующих агентов. Жидкие лекарственные формы могут быть также изготовлены путем восстановления твердого вещества, например, из саше.

Связывающие молекулы по данному изобретению будут вводиться в количестве, эффективном для лечения состояния, о котором идет речь, т.е. в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как конкретное состояние, по поводу которого проводится лечение, возраста, пола и веса пациента, а также является ли введение связывающих молекул самостоятельным лечением или оно проводится в комбинации с одним или более дополнительных антиаутоиммунных или противовоспалительных методов лечения.

Схемы приема лекарственных средств можно регулировать, чтобы обеспечить оптимальный желаемый ответ. Например, может быть введен один болюс, несколько разделенных доз могут быть введены в течение некоторого времени, или доза могут быть пропорционально уменьшена или увеличена в зависимости от остроты терапевтической ситуации. Особенно полезным является изготовление парентеральных композиций в стандартной лекарственной форме для простоты введения и однородности дозирования. Стандартная лекарственная форма при использовании в данном документе, относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для пациентов/субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для стандартных лекарственных форм по настоящему изобретению, как правило, диктуется и непосредственно зависит от (а) уникальных характеристик химиотерапевтического агента и конкретного терапевтического или профилактического эффекта, которые должны быть достигнуты, и (b) ограничений, присущих в технике компаундирования такого активного соединения для лечения чувствительности у субъектов.

Таким образом, квалифицированным специалистам понятно, исходя из раскрытия, представленного в данном документе, что дозы и режим дозирования корректируются в соответствии со способами, хорошо известными в терапевтической области. Это означает, что может быть легко установлена максимально переносимая доза и может быть также определено эффективное количество, обеспечивающее обнаруживаемый терапевтический эффект для пациента, так же как и требования к времени введения каждого агента для достижения видимого терапевтического эффекта для пациента.

Таким образом, хотя некоторые дозы и схемы режима введения приведены в качестве примеров в данном документе, эти примеры никоим образом не ограничивают дозы и режимы введения, которые могут понадобиться для пациента в практике применения настоящего изобретения.

Следует отметить, что значения дозировки могут изменяться, в зависимости от типа и тяжести состояния, которое следует облегчить, и может включать одну или более доз. Кроме того, необходимо понимать, что для любого конкретного пациента, конкретные схемы введения должны быть скорректированы через некоторое время согласно индивидуальной потребности и на усмотрение медицинского работника, который осуществляет введение или контролирует введение композиций, и что диапазоны концентрации, приведенные в данном описании, приведены только в качестве примера и не предназначены для ограничения объема или практики заявленных композиций. Кроме того, режим дозирования с композициями по данному изобретению может быть основан на различных факторах, включая тип заболевания, возраст, вес, пол, состояния здоровья пациента, тяжесть состояния, путь введения и конкретную используемую связывающую молекулу. Таким образом, режим дозирования может широко варьироваться, но может определяться регулярно с помощью стандартных методов. Например, дозы могут быть скорректированы на основе фармакокинетических и фармакодинамических параметров, которые могут включать клинические эффекты, такие как токсические эффекты или лабораторные значения. Таким образом, настоящее изобретение охватывает индивидуальное повышение дозы, которое определяется квалифицированным специалистом. Определение необходимой дозы и режимы хорошо известны в соответствующей области техники и будут понятны специалисту в данной области после ознакомления с идеями, раскрытыми в данном документе.

Примеры подходящих способов введения предусмотрены выше.

Предполагается, что подходящая доза связывающей молекулы по данному изобретению будет в диапазоне от 0,1-100 мг/кг, в том числе около 0,5-50 мг/кг, например, около 1-20 мг/кг. Связывающая молекула может быть введена, например, в дозе по меньшей мере 0,25 мг/кг, например, по меньшей мере 0,5 мг/кг, в том числе не менее 1 мг/кг, например, по меньшей мере 1,5 мг/кг, например, также как не менее 2 мг/кг, например, по меньшей мере 3 мг/кг, в том числе по меньшей мере 4 мг/кг, например, по меньшей мере 5 мг/кг; и например вплоть до максимально 50 мг/кг, в том числе вплоть до максимально 30 мг/кг, например, вплоть до максимально 20 мг/кг, в том числе вплоть до максимально 15 мг/кг. Введение будет повторяться обычно в подходящие промежутки времени, например, раз в неделю, раз в две недели, один раз каждые три недели или один раз каждые четыре недели, и так долго, как будет сочтено целесообразным ответственным врачом, который может в некоторых случаях увеличить или уменьшить дозу при необходимости.

Эффективное количество для терапии аутоиммунных или воспалительных расстройств может измеряться его способностью стабилизировать прогрессирование заболевания и/или улучшить симптомы у пациента и предпочтительно вызвать обратное развитие проявлений заболевания. Способность связывающей молекулы по данному изобретению подавлять аутоиммунные или воспалительные нарушения может оцениваться в *in vitro* анализах, например, как описано в приведенных примерах, а также в подходящих животных моделях, которые прогнозируют эффективность при таких нарушениях. Подходящая схема дозирования будет выбрана для того, чтобы обеспечить оптимальный терапевтический ответ в каждой конкретной ситуации, например, введение в виде одного болюса или в виде непрерывной инфузии с возможной корректировкой дозы в зависимости от остроты каждого случая.

Диагностическое использование и композиции

Связывающие молекулы по настоящему изобретению также используются в диагностических процессах (например, *in vitro*, *ex vivo*). Например, они могут

использоваться для обнаружения или измерения уровня PD1 в образцах, полученных от пациента (например, образец ткани или образец жидкости тела, такой как воспалительный экссудат, кровь, сыворотка крови, жидкость кишечника, слюна или моча). Подходящие методы обнаружения и измерения включают иммунологические методы, такие как проточная цитометрия, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), хемилюминесцентный анализ, радиоиммуноанализ и иммуногистология.

Готовые изделия

В другом варианте осуществления изобретения обеспечивается готовое изделие, содержащее материалы, полезные для лечения или профилактики расстройств или состояний, описанных выше.

Готовое изделие содержит контейнер, содержащий фармацевтическую композицию с антителом, с обозначением и возможно инструкцию. Подходящие контейнеры включают, например, флаконы, ампулы, шприцы и аналитические пробирки.

Контейнеры могут быть сделаны из ряда материалов, таких как стекло или полимерный материал. Контейнер содержит композицию согласно изобретению, которая является эффективной для лечения заболевания или нарушения, опосредованного PD-1, и может иметь выход со стерильным доступом (например, контейнер может быть пакетом для внутривенного раствора или флаконом, имеющим пробку, проницаемую для гиподермальной иглы для инъекций). Активный агент в композиции является анти-PD-1-антителом согласно изобретению. Обозначение на контейнере и инструкция, присоединенная к нему, указывает на то, что композицию применяют для лечения выбранного заболевания. Готовое изделие может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как фосфатно-буферный раствор, раствор Рингера и раствор декстрана. Он может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой и потребительской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по применению.

Для наилучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны толковаться как ограничивающие сферу применения изобретения в любой форме.

Примеры

Пример 1

Создание наивной Fab-библиотеки человеческих антител MeganLib™

Суммарную РНК В-лимфоцитов из индивидуальных образцов крови более тысячи человеческих доноров выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit согласно предлагаемому протоколу (от QIAGEN). Концентрацию РНК определяли с помощью набора Nanovue (от GE Healthcare) и проверяли качество выделенной РНК с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора MMLV RT kit (от Evrogen) согласно рекомендуемому протоколу с использованием обратной транскриптазы MMLV и рандом-гексамерных олигонуклеотидов в качестве затравки.

Продукты обратной транскрипции использовали в качестве матрицы в двухступенчатой полимеразной цепной реакции для получения генов вариабельных доменов, фланкированных сайтами рестрикции, с использованием набора олигонуклеотидов и протоколам авторов [J Biol Chem. 1999 Jun 25; 274(26): 18218-30].

Полученный ДНК препарат VL-СК-VH (фиг. 1) обрабатывали эндонуклеазами рестриктазами NheI/Eco91I и лигировали в оригинальную фагмиду pH5 (фиг. 2А). Продукты лигирования трансформировали в электрокомпетентные клетки штамма

SS320, приготовленные согласно протоколам [Methods Enzymol. 2000;328: 333-63.]. Репертуар комбинаторной фаговой Fab-дисплейной библиотеки MeganLib™ составил 10^{11} трансформантов. Препараты фага Fab-библиотек были приготовлены согласно процедуре, описанной ранее [J Mol Biol. 1991 Dec 5; 222(3): 581-97].

Пример 2

Селекция Fab-библиотек фаговых антител

Специфичные анти-PD-1 фаговые Fab-антитела человека выделяли из комбинаторной фаговой Fab-дисплейной библиотеки MeganLib™. Селекцию проводили на рекомбинантном PD-1 человека, осуществляя панирование в условиях, как описано ранее (J Biol Chem. 1999 Jun 25; 274(26): 18218-30; Nat Biotechnol. 1996 Mar;14(3):309-14; J Mol Biol. 1991 Dec 5; 222(3): 581-97). Для осуществления селекции методом пэннинга, PD-1 человека в 50 мМ карбонатном буфере (pH 9,5) адсорбировали в течение ночи при 4°C на поверхности сорбирующих пробирок HighSorb (Nunc). Пробирки промывали ФСБ (pH 7,4), затем блокировали раствором ФСБ (pH 7,4) - обезжиренное молоко (0,5% мас./об.) в течение 1 ч. Далее, 2-4 мл раствора фагов в ФСБ (pH 7,4) - обезжиренное молоко (0,5% мас./об.), в концентрации 10^{13} фаговых частиц на мл добавляли в пробирку с антигеном и инкубировали в течение 1 часа при перемешивании. Несвязавшиеся фаги удаляли в ходе серий циклов промывки с использованием раствора ФСБ (pH 7,4) - Твин 20 (0,1% об./об.). Количество отмывок увеличивали от первого раунда к третьему раунду 20-30-40 раз, соответственно. Оставшиеся связанными фаговые частицы элюировали 100 мМ раствором Gly-HCl (pH 2,5) в течение 15 мин при перемешивании, затем нейтрализовали 1 М TRIS-HCl (pH 7.6). Бактерии штамма E. coli TG1 инфицировали полученными фагами, затем фаги выделяли и использовали в следующем цикле селекции. После двух-трех раундов селекции из фагов выделяли ДНК (фагмиды) и гены

вариабельных доменов антител клонировали в экспрессионные вектора (Фиг. 2Б) для

наработки Fab в клетках E. coli.

Пример 3

Анализ специфического связывания Fab с PD1 человека

ИФА (ELISA) использовали для измерения связывания исследуемых Fab-фрагментов с PD1 человека. В качестве позитивного контроля использовали Fab с опубликованной последовательностью Nivolumab (от Bristol-Myers Squibb). Для анализа специфического связывания лунки планшетов ELISA (medium binding от Greiner bio one) покрывали 50 мкл (0,5 мкг/мл в 1 × покрывающем карбонатном буфере, pH 9.5) PD1-H6F, герметично закрывали и инкубировали в течение ночи при 4°C. Все последующие этапы проводили по стандартному протоколу ИФА с использованием высокопроизводительной автоматизированной платформы на базе роботизированных систем Genetix Qpix2xt (от Molecular Device) и Tecan Freedom EVO 200 (от Tecan). Для блокирования неспецифического связывания добавляли блокирующий буфер ВВ (200 мкл 0,5% нежирного молока в ФСБ). Планшеты инкубировали на шейкере в течение часа при комнатной температуре. После отмывок ФСБ-Твином добавляли по 50 мкл на лунку тестируемого клеточного супернатанта, содержащего исследуемый Fab, смешанного с равным объемом ВВ. Планшеты снова инкубировали, встряхивая, один час при комнатной температуре, после чего каждую лунку планшетов три раза промывали буфером ФСБ-Твин. После промывания добавляли (50 мкл/лунку) анти-человеческого Fab HRP-конъюгированного вторичного антитела (от Pierce-ThermoScientific) в соотношении 1:5000 в ФСБ-Твин. Планшеты встряхивали на ротационном шейкере (50 мин, комнатная температура) и промывали три раза буфером ФСБ-Твин, как описано выше. Колориметрический сигнал развивали добавлением ТМВ (50 мкл/лунку) до

насыщения (в среднем 3-5 мин), затем дальнейшее развитие останавливали добавлением стопового раствора (30 мкл/лунку, 10% серная кислота). Цветовой сигнал измеряли при длине волны 450 нм, используя подходящий планшет-ридер Tecan-Sunrise (от Tecan). Степень связывания антитела была пропорциональна продуцированию цветового

сигнала.

Пример 4

Конкурентный ИФА анализ блокирования взаимодействия PD1 рецептора и PDL1 лиганда

Конкурентный ИФА (ELISA) использовали для проверки антагонистической способности отобранных ранее специфичных Fab против PD1 человека. В качестве позитивного контроля антагониста использовали Fab с опубликованной последовательностью Nivolumab (от Bristol-Myers Squibb). Рецептор PD1-H6F иммобилизовали в лунках планшетов ELISA (medium binding от Greiner bio one) по 50 мкл с концентрацией 1 мкг/мл в 1 × покрывающем карбонатном буфере, pH 9.5 и инкубировали в течение ночи при 4°C. Все последующие этапы проводили по стандартным ИФА протоколам с использованием высокопроизводительной автоматизированной платформы на базе роботизированных систем Genetix Qpix2xt (от Molecular Device) и Tecan Freedom EVO 200 (от Tecan). Для блокирования неспецифического связывания добавляли блокирующий буфер ВВ (200 мкл 0,5% нежирного молока в ФСБ). Планшеты инкубировали на шейкере в течение часа при комнатной температуре.

После отмывок от ВВ планшета, содержащего PD1 рецептор, туда переносили по 150 мкл тестируемого клеточного супернатанта, содержащего исследуемый Fab, инкубировали в течение 45 минут при комнатной температуре и шейкинге при 500 об/мин. Затем смешивали с 50 мкл PDL1-Fc в конечной концентрации 1 мкг/мл в ФСБ-Твин, инкубировали в течение 45 минут в тех же условиях, после чего каждую лунку планшетов три раза промывали буфером ФСБ-Твин. Добавляли по 50 мкл/лунку козьиного анти-человеческого IgG (Fc) HRP-конъюгированного вторичного антитела (от Sigma) в разведении 1:5000 в ФСБ-Твин. Инкубировали 45 мин при комнатной температуре и встряхивании 500 об./мин, после чего каждую лунку планшетов три раза промывали буфером ФСБ-Твин, как описано выше. Колориметрический сигнал развивали добавлением ТМВ (50 мкл/лунку) до насыщения (в среднем 3-5 мин), затем дальнейшее развитие останавливали добавлением стопового раствора (30 мкл/лунку, 10% серная кислота). Цветовой сигнал измеряли при длине волны 450 нм, используя подходящий планшет-ридер Tecan-Sunrise (от Tecan). Степень связывания Fab была обратно пропорциональна продуцированию цветового сигнала.

Пример 5

Сравнительный скрининг анти-PD1 Fab кандидатов человека по koff

Koff-скрининг производился с использованием прибора Pall Forte Bio Octet Red 96.

Анти FАVСН1-биосенсоры в течение 30 минут регидратировались в рабочем буфере, содержащем 10 мМ ФСБ, pH 7.2-7.4, 0.1% Твин-20, 0,1% БСА. В исследуемые образцы супернатантов E. coli добавляли рабочий буфер до конечной концентрации 1 ×. Затем анти FАVСН1-биосенсоры погружались в супернатанты E. coli, содержащие Fab-фрагменты кандидатов антител, на 12 часов при 4°C. Сенсоры с иммобилизованными на поверхности Fab - фрагментами переносились в лунки с рабочим буфером, где прописывалась базовая линия (60 с). Далее сенсоры переносились в лунки с раствором аналита (PD1, 30 мкг/мл) для ассоциации комплекса антиген-антитело (300 с). Затем сенсоры возвращали в лунки, содержащие рабочий буфер, для последующей стадии

диссоциации (300 с). После каждого эксперимента использованные сенсоры регенерировались путем трехкратного помещения их в буфер для регенерации (Gly-HCl, pH 1,7) после чего могли быть использованы в следующем эксперименте. Анализ полученных кривых проводился с помощью программного обеспечения Octet Data Analysis (версия 7.0) согласно стандартной процедуре с использованием модели взаимодействия 1:1.

Пример 6

Продукция рекомбинантных антигенов и антител в суспензионной культуре клеток млекопитающих

Антитела и антигены продуцировали в клетках постоянной клеточной линии, полученной из клеток яичника китайского хомячка (линия CHO-K1), согласно опубликованным протоколам [Biotechnol Bioeng. 2005 Sep 20; 91(6): 670-677, Liao Metal., 2004; Biotechnol Lett. 2006 Jun; 28(11): 843-848; Biotechnol Bioeng. 2003 Nov 5; 84(3): 332-342]. Использовали клетки, конститутивно экспрессирующие ген белка EBNA1 (Epstein-Barrvirus nuclear antigen 1). Суспензионное культивирование осуществляли в колбах на орбитальном шейкере, с использованием бессывороточных сред производства компании Life Technologies Corporation и согласно инструкциям производителя. Для транзientной экспрессии клетки в концентрации 2×10^6 /мл трансфецировали с помощью линейного полиэтиленimina (ПЭИ «МАХ», компания «Polysciences»). Соотношение ДНК/ПЭИ составляло 1:3/1:10. Через 5-7 дней после трансфекции культуральную среду центрифугировали при 2000 g в течение 20 минут и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Целевые белки выделяли из культуральной жидкости с помощью аффинной хроматографии.

Рекомбинантный белок PD1, содержащий шесть аминокислот His на С-конце белка, выделили и очистили из культуральной жидкости, используя смолу Profinity IMAC Ni-charged (от компании Bio-Rad). До очистки в культуральную жидкость добавили NiCl_2 до концентрации 1 mM. Далее добавили в культуральную жидкость 5 мл смолы Profinity IMAC Ni-charged и перемешивали на качалке 1 час при комнатной температуре. Перенесли сорбент на колонку Thermo scientific Polypropylene columns объемом 5 мл, промыли 5 колоночными объемами ФСБ, чтобы вымыть неспецифически связывающие компоненты. Связанный антиген элюировали, используя 0,3 M имидазол, pH 8, 150 mM NaCl. Далее белок перевели в ФСБ (pH 7,4) с помощью диализа, используя технологию SnakeSkin Dialysis Tubing, профильтровали (0,22 мкм), перенесли в пробирки и хранили при -70°C .

Рекомбинантные белки PD1-Fc и PDL1-Fc из культуральной жидкости выделили и очистили, используя колонку для аффинной хроматографии протеин А. Осветленную культуральную жидкость пропускали через колонку HiTrap rProtein A Sepharose FF объемом 5 мл (GE Healthcare), которая была уравновешена фосфатно-солевым буфером (ФСБ, pH 7,4). Затем колонку промыли 5 колоночными объемами ФСБ, чтобы вымыть неспецифически связывающие компоненты. Связанный антиген элюировали, используя 0,1 M глициновый буфер pH 3. Главный протеиновый пик элюции собрали и довели его pH до нейтральности с помощью 1 M буфера Tris (pH 8). Все стадии проводили при скорости потока 110 см/ч. Далее белок перевели в ФСБ (pH 7,4) с помощью диализа, используя технологию SnakeSkin Dialysis Tubing, профильтровали (0,22 мкм), перенесли в пробирки и хранили при -70°C .

Антитела IgG1 очищали на колонке Hi Trap rProteinA FF объемом 1 мл (GE Healthcare) согласно методике, описанной выше для антигена PD1-Fc. Чистоту полученного раствора белка оценивали с помощью SDS-гель-электрофореза (фиг. 3А и 3Б).

Пример 7

Реактивация NFAT-сигналинга анти-PD1 антителами в репортерной клеточной линии Jurkat-NFAT-PD1

5 Был проведен инжиниринг человеческой линии Т-клеточного происхождения Jurkat путем внедрения в ее геном двух генетических конструкций. Одна конструкция кодирует ген рецептора PD1 человека. Вторая конструкция кодирует ген люциферазы luc2P, находящийся под контролем NFAT-чувствительного генетического элемента. В результате была получена репортерная клеточная линия Jurkat-PD1-NFAT-Luc2, которая экспрессирует на поверхностной мембране рецептор PD1 и содержит NFAT-зависимый

10 промотор, который направляет транскрипцию гена люциферазы luc2P. Синтез фермента люциферазы в клетках этой линии пропорционален уровню активности NFAT. Которая, в свою очередь, отражает общий уровень активации клеток.

Взаимодействие PDL1 с PD1 ингибирует передачу сигнала с TCR-рецепторов на NFAT-промотор. Антитела анти-PD1 разобщают взаимодействие PDL1-PD1 и происходит

15 реактивация внутриклеточной сигнализации.

За день до анализа подготовили планшет для эксперимента: в 96 луночный планшет из непрозрачного пластика внесли раствор анти-CD3 антител в PBS с концентрацией 1 мкг/мл с 5 мкг/мл PDL1-Fc. В качестве положительного контроля активации использовали раствор анти-CD3 антител без PDL1. Оставили на ночь при +4°C.

20 Приготовили разведения анализируемых антител от 11 мкг/мл с шагом 3 десять точек в среде роста клеток, инкубировали клетки с разведениями антитела в течение 20 минут при комнатной температуре, затем внесли клетки с антителами в подготовленный планшет. Добавили во все лунки раствор анти-CD28 антител в среде роста клеток до конечной концентрации в лунке 0,25 мкг/мл. Оставили в CO₂ инкубаторе

25 на 6 часов.

Заранее подготовленный по протоколу субстрат к люциферазе Bio-Glo Luciferase assay system (Promega) разморозили с -70°C и добавили из расчета V клеток/V субстрата. Измеряли уровень люминесценции на Fluoroscan Ascent (фиг. 5). Анти-PD1 антитела реактивируют уровень люминесценции в репортерной линии Jurkat-PD1-NFAT, а значит,

30 связываются с рецептором и ингибируют взаимодействие PDL1/PD1. Лучшим в этом тесте показал себя BCD-100 эффективная доза (ED50) составила 114,6 нг/мкл.

Пример 8

Стимуляция продукции ИЛ-2 ант-PD1 антителами в цельной крови человека в присутствии стафилококкового энтеротоксина

35 Суперантигены, такие как цитотоксин SEB (стафилококковый энтеротоксин) активируют Т-клетки путем связывания молекулы МНС класса II на антиген-презентирующих клетках с Vβ-элементом TCR-рецептора, что приводит к продукции цитокинов, включая аутокринный фактор роста IL2.

При постановке теста за основу взяли описание из статьи Phase I Study of Pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 Monoclonal Antibody) in Patients With Advanced Solid Tumors (Clin Cancer Res Published OnlineFirst May 14, 2015).

40

Вкратце, цельную кровь инкубировали со SEB или с SEB плюс анти-PD1-антитела, далее измеряли концентрацию ИЛ-2.

Гепаринизированную цельную кровь донора развели в 5 раз в ростовой среде (RPMI с 10% бычьей инактивированной сыворотки). К разведенной крови добавили SEB до конечной концентрации 1 мкг/мл. Приготовили разведения анти-PD1 антител в ростовой среде от 50 мкг/мл с шагом 3, всего восемь разведений. К разведенным антителам добавили раствор крови и SEB в среде роста (объем/объем). Планшеты инкубировали

45

3-е суток в CO₂ инкубаторе при 37°C. Затем измеряли в отобранных образцах концентрацию ИЛ-2 методом ELISA (фиг. 6), согласно протоколу к коммерческому набору (Human IL-2 Quantikine ELISA Kit от R&D Systems). Лучшим в этом тесте был BCD-100, он проявил большую функциональную активность, чем контрольные антитела.

Пример 9

Анализ антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) антител против PD1 на линии клеток Jurkat-PD1

Собрали из флаконов выращенную клеточную культуру Jurkat-PD1, предназначенную для использования в количественном определении, центрифугировали в течение 5 минут при 200 g. Надосадочную жидкость слили, еще раз отмыли в среде для количественного определения.

Суспендировали осадок клеток в 5 мл среды для количественного определения, определили жизнеспособность и количество клеток. Приготовили суспензию клеток для засева белых 96-ти луночных культуральных планшетов: 3×10^5 кл/мл.

Внесли разведения испытуемого образца в лунки 96-луночного планшета. В лунки с испытуемыми образцами добавили клеточной суспензии Jurkat-PD1, поместили планшет на 15-30 минут в CO₂ инкубатор.

Приготовили клеточную суспензию PBMCs с концентрацией $7,5 \cdot 10^6$ кл/мл и внесли в лунки с испытуемыми образцами. Инкубировали планшет при температуре 37°C в CO₂ инкубаторе 4 часа.

Смешали Assay Buffer и AAF-Glo™ Substrate из набора CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay, добавили в каждую лунку с испытуемыми образцами. Инкубировали планшет 15 минут при комнатной температуре. Измеряли люминесценцию на приборе Fluoroskan Ascent FL (фиг. 7). Принцип метода основан на определении активности внутриклеточных протеаз, полученный сигнал люминесценции пропорционален количеству лизированных клеток. Анти-PD1 антитела не обладают детектируемой антителозависимой клеточной цитотоксичностью.

Пример 10

Иммуноферментный анализ взаимодействия анти-PD1 антител с PD1 и другими антигенами

ИФА (ELISA) использовали для измерения сравнительной аффинности антител к PD1 и другим антигенам. Для анализа связывания лунки планшетов ELISA (medium binding от Greiner bio one) покрывали 50 мкл PD1-Fc, IL6R-Fc, CD38-Fc, HER3-Fc, IGFR-Fc, CD3-Fc, IL23-Fc (1 мкг/мл для PD1 и 5 мкг/мл для остальных антигенов в 1 × покрывающем карбонатном буфере), герметично закрывали и инкубировали в течение ночи при 4°C. Все последующие этапы проводили по стандартному ИФА протоколу. Для блокирования неспецифического связывания добавляли блокирующий буфер ВВ (200 мкл 0,5% нежирного молока в ФСБ). Планшеты инкубировали на шейкере в течение часа при комнатной температуре. После отмывок ФСБ-Твином добавляли по 50 мкл на лунку тестируемых антител в концентрации 5 мкг/мл в ФСБ-Твин, Планшеты снова инкубировали, встряхивая, один час при комнатной температуре, после чего каждую лунку планшетов три раза промывали буфером ФСБ-Твин. После промывания добавляли (50 мкл/лунку) анти-человеческого Fab HRP-конъюгированного вторичного антитела (от Pierce-ThermoScientific) в соотношении 1:5000 в ФСБ-Твин. Планшеты встряхивали на ротационном шейкере (50 мин, комнатная температура) и промывали три раза буфером ФСБ-Твин, как описано выше. Колориметрический сигнал развивали добавлением ТМВ (50 мкл/лунку) до насыщения (в среднем 3-5 мин), затем дальнейшее

развитие останавливали добавлением стопового раствора (30 мкл/лунку, 10% серная кислота). Цветовой сигнал измеряли при длине волны 450 нм, используя подходящий планшет-Tecan-Sunrise (от Tecan). Степень связывания антитела была пропорциональна продуцированию цветового сигнала (фиг. 4). Анти-PD1 антитело специфически связывается с PD1 и не связывается с другими исследуемыми антигенами.

Пример 11

Иммуноферментный анализ взаимодействий анти-PD1 антител с рецепторами PD1 разных организмов

ИФА (ELISA) использовали для измерения сравнительной аффинности антител к рецепторам PD1 разных организмов. Для анализа связывания лунки планшетов ELISA (medium binding от Greiner bio one) покрывали 50 мкл PD1-Fc человека и яванского макака, PD1 мыши, крысы, собаки, кролика, морской свинки (0,5 мкг/мл в 1 × покрывающем карбонатном буфере), герметично закрывали и инкубировали в течение ночи при 4°C. Все последующие этапы проводили по стандартному ИФА протоколу, описанному выше. Анти-PD1 антитело специфически связывается с PD1 человека и обезьяны циномолгус и не связывается другими исследуемыми рецепторами (фиг. 9).

Пример 12

Иммуноферментный анализ взаимодействий анти-PD1 антител с рецепторами из семейства CD28

ИФА (ELISA) использовали для измерения сравнительной аффинности антител к рецепторам из семейства CD28. Для анализа связывания лунки планшетов ELISA (medium binding от Greiner bio one) покрывали 50 мкл человеческими PD1-Fc, CD28, CTLA-4 и ICOS-Fc (0,5 мкг/мл в 1 × покрывающем карбонатном буфере), герметично закрывали и инкубировали в течение ночи при 4°C. Все последующие этапы проводили по стандартному ИФА протоколу, описанному выше. Анти-PD1 антитело связываются только с PD1 и не связывается с другими представителями семейства CD28 (фиг. 10).

Пример 13

Анализ взаимодействий анти-PD1 антител с рецепторами PD1 человека и циномолгуса на приборе Octet RED 96

Константы аффинности связывания антитела с рецепторами PD1 человека и циномолгуса получили с помощью прибора OctetRed 96 (от ForteBio). Антитела BCD-100 были неспецифически иммобилизованы на поверхность аминореактивных сенсоров второго поколения (ForteBio, Pall) по стандартному протоколу согласно инструкции производителя для подготовки и иммобилизации AR2G сенсоров. Анализ был произведен при 30°C с использованием PBS, содержащим 0,1% Твин-20 и 0,1% БСА в качестве рабочего буфера. Титрование PD1 человека и обезьяны циномолгус производили с использованием рабочего буфера от концентрации 126 нМ до 2 нМ с шагом 2.

Кривые связывания с вычетом базового сигнала анализировали с помощью программы Octet Data Analysis (версия 7.0) согласно стандартной процедуре с использованием модели взаимодействия 1:1. Анти-PD1 антитело специфически связывается с антигеном PD1 человека и обезьяны циномолгус (фиг. 11).

Пример 14

Анализ взаимодействий анти-PD1 антител с FcγRn and Fcγ-рецепторами при помощи Octet RED 96

Для анализа взаимодействия антител с FcγRIIIaV, FcγRIIIaH, FcγRIIb, FcγRIa, FcγRn использовался прибор Forte bio Octet RED96 и биосенсоры, покрытые стрептавидином (SA-Streptavidin).

В ходе эксперимента проводили ориентированную иммобилизацию биотин-меченных

рецепторов на поверхность, покрытых стрептавидином, сенсоров. Готовили серию разведений антител от концентрации 500 мкг/мл с шагом 2 на 7 точек и помещали в лунки 96-луночного планшета. Далее проводилась стадия ассоциации путем погружения сенсоров в растворы антител с различной концентрацией, после этого проводилась

стадия диссоциации путем погружения сенсоров в рабочий буфер.

Для анализа аффинности антител к FcγRIIIaV, FcγRIIIaH, FcγRIIb, FcγRIa использовался рабочий буфер PH7.4, для анализа аффинности к FcRn - рабочий буфер PH6.0.

Проводили SteadyState анализ полученных кривых с вычетом референсного сигнала с использованием модели 2:1 (гетерогенный лиганд) согласно стандартной процедуре.

Результаты представлены на фиг. 8. Анализ аффинности к Fcγ-рецепторам свидетельствует о том, что эффекторные функции модифицированного IgG1 снижены, примерно сопоставимы с IgG4. Анализ аффинности к FcRn-рецептору позволяет предположить, что фармакокинетика анти-PD1 антитела сходна с фармакокинетикой антитела Nivolumab.

Пример 15

Определение агрегационной стабильности анти-PD1 антитела в условиях термостресса

Препарат антитела BCD-100 с концентрацией 9 мг/мл в ФСБ буфере прогревался в течение 12 часов при температуре 50°C. Определение агрегации после термостресса проводили методом гель-фильтрационной высокоэффективной хроматографии.

Хроматографию проводили на системе ВЭЖХ (Agilent) 1100 на колонке Tosoh TSK-Gel G3000SWXL, 7.8 мм × 30 см, кат. №08541 с предколонкой Tosoh TSKgel Guard SWXL, 6.0 мм × 4.0 см, с диаметром частиц 7 мкм, кат. №08543. Элюирование проводилось в изократическом режиме подвижной фазой: 50 mM NaOAc, 0,3 M NaCl, pH 7.0 на скорости потока 0,5 мл/мин. Детектирование проводилось на длинах волн 214 и 280 нм. Образцы антител были разведены буфером ФСБ, pH 7.5, до концентрации ~1 мг/мл. Объем вводимой пробы - 10 мкл. Предварительно была хроматографирована калибровочная смесь Gel filtration standard (от Bio-Rad), кат. №151-1901. На фиг. 12 представлены совмещенные хроматограммы: красный - интактный, синий - 12 ч инкубации при 50°C. Анти-PD1 антитело демонстрирует стабильность (разница между содержанием агрегатов в растворе до термостресса и после составила не более 5%).

Пример 16

Создание стабильной клеточной линии, продукция и очистка анти-PD1 антитела

Стабильная клеточная линия продуцент моноклонального антитела BCD-100 была получена путем трансфекции методом электропорации с использованием прибора Neon

Transfection System (Life Technologies) родительской суспензионной клеточной линии CHO-S векторными конструкциями, содержащими легкие и тяжелые цепи антитела в оптимизированном соотношении. Клональные линии с высоким уровнем продуктивности (более 1 г/л) были получены с использованием роботизированной платформы ClonePix (Molecular Devices) и предварительных этапов селекции мини-пулов с использованием антибиотиков в разных форматах культивирования. Анализ продуктивности отобранных клонов проводился на базе автоматизированной системы Biomek FX robotics (Beckman Coulter) и Анализ продуктивности проводился с использованием аналитической системы Octet RED96 (Pall Life Sciences). DOE по подбору базовой среды и схемы культивирования осуществлялся на базе автоматизированной системы Biomek FX robotics (Beckman Coulter) Для культивирования продуцента использовали бессывороточные среды и фидинги, не содержащие белков животного происхождения.

Осветление культуральной жидкости проводили на глубинном фильтре «Zeta Plus

Maximizer 60M02» (3M). Первичную очистку антитела проводили на аффинном сорбенте с белком А. Специфическую элюцию целевого белка проводили в кислых условиях pH 3.3-3.8 в глициновом буфере. Полученный элюат выдерживали в кислом pH в течение 30-60 минут для вирусной инактивации, а затем нейтрализовали 1 М раствором Tris-ОН. до значения pH 6.8-7.2. Финальную хроматографическую очистку в режиме проскока проводили на сорбенте CaptoAdhere (GE HealthCare LifeSciences) для удаления остаточных ДНК, белков клеток продуцента, отщепленного лиганда аффинного сорбента, агрегатов и фрагментов антител. Для этого раствор белка пропускали через подготовленный сорбент, в pH 6,8-7,2 при низком значении кондуктивности ($<2 \text{ мС/см}^2$). Очищенный белок подвергали противовирусной фильтрации с использованием набора фильтров Viresolve PRO (Millipore), концентрированию и диафильтрации против конечного буфера, содержащего гистициновый буфер (pH 6.0-6.5), Полисорбат-80 и трегалозу. Концентрация полученного белка составляла 50 мг/мл и более.

Пример 17

Получение фармацевтической композиции, содержащей анти-PD1 антитело, согласно изобретению

Концентрация антитела к PD1 (BCD-100) - 25 мг/мл, натрия ацетат т/г - 0.436 мг, маннитол - 50 мг, коллифор (полоксамер) P188 - 0,2 мг, уксусная кислота ледяная pH 5,15 Осм $300 \pm 20 \text{ мОсм}$ до pH 5.0

Пример 18

Исследование кросс-реактивности анти-PD1 антитела в нормальных замороженных тканях человека

Исследование кросс-реактивности препарата анти-PD1 проведено на нормальных замороженных тканях человека (аутопсийный материал). Для анализа использовали 33 ткани человека: гипофиз, сетчатка глаза, желудок, клетки периферической крови, кора головного мозга, кожа, легкое, лимфатический узел, матка, миндалины, мозжечок, молочная железа, мочевого пузырь, мочеточник, надпочечник, периферический нерв, околоушная железа, печень, поджелудочная железа, поперечнополосатая мышца, почка, предстательная железа, селезенка, сердце, спинной мозг, толстая кишка, тонкая кишка, фаллопиева труба, щитовидная и паращитовидная железы, эндотелий сосудов, семенник, яичник. В качестве положительного контроля использовали замороженную суспензию клеток Jurkat-PD1, содержащую мембранный антиген PD1.

Изготовление замороженных блоков тканей. Кусочки тканей органов заливали средой для заливки и замораживания Tissue-Tec (Sacura), замораживали в парах жидкого азота и хранили при температуре -70°C . В качестве положительного контроля использовали осажденную суспензию клеток Jurkat-PD1, экспрессирующих PD1, $1 \cdot 10^6$ кл/мл ресуспендировали в 1 мл среды для заливки и замораживания Tissue-Tec (Sacura), замораживали полученную суспензию в парах жидкого азота и хранили при температуре -70°C .

Срезы толщиной 5 мкм готовили на криотоме Thermo HM525U. Фиксировали холодным ацетоном в течение 10 мин, сушили на воздухе при комнатной температуре в течение 2-24 ч. Фиксированные срезы хранили в темноте при -70°C .

Проводили меченье FITC препарата анти-PD1 производства ЗАО «Биокад», Россия, при помощи набора для конъюгации белков с FITC. (FluoReporter FITC Protein Labeling Kit, Invitrogen), в соответствии с инструкцией к набору.

Проведена блокировка эндогенной пероксидазы. Срезы дважды промывали раствором ФБС (содержанием 0,05% Твин 20), проводили блокировку эндогенной пероксидазы с помощью Hydrogen Peroxide Block (Thermo) 10 минут при комнатной

температуре, дважды промывали ФБС.

Перед окрашиванием была проведена блокировка неспецифического окрашивания: срезы обрабатывали раствором Protein Block Serum-Free (Dako) 10 мин при комнатной температуре. Без промывки наносили первые антитела.

5 Первичное антитело в рабочей концентрации 0,2 мкг/мл (меченое FITC антитело Анти-PD1, изотипическое человеческое антитело IgG1 в концентрации 0,2 мкг/мл) наносили на срезы и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После окончания инкубации промывали дважды раствором ФБС по 5 мин.

10 Наносили раствор моноклональных мышиных антител против FITC, конъюгированных с пероксидазой (рабочее разведение 1/1000), инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Промывали дважды раствором ФБС по 5 мин. Срезы обрабатывали ДАБ окрашивающим раствором в течение 10 минут. Промывали дважды деионизированной водой.

15 Проводили процедуру подкрашивания ядер гематоксилином в течение 10 мин, промывали дважды деионизированной водой. Обрабатывали срезы 1%-ным раствором HCl в течение 1 сек, промывали трижды деионизированной водой. Подсинивание ядер проводили в течение 45 сек насыщенным раствором лития карбоната. После окончания окрашивания срезы промывали дважды деионизированной водой, дегидратировали в спиртовых растворах с повышающейся концентрацией спирта (70%, 80%, 96%),
20 просветляли в заменителе ксилола, заключали в заливочную среду и монтировали покровные стекла с помощью прибора ClearVue (Thermo).

Проведено полуколичественное цитофотометрическое определение интенсивности позитивного окрашивания. Изображение препарата в световом микроскопе Leica DM 6000 В передавалось с помощью видеокамеры Leica DFC 420 на монитор компьютера
25 и записывалось на жесткий диск, с помощью прилагавшегося пакета программ Leica Application Suite (версия 2.5.0.R1). Съемки проводили, используя объектив с увеличением 40, при определенном настроенном (цифровая настройка) стандартном уровне освещенности микропрепарата. Интенсивность окрашивания на снимке пропорциональна относительной концентрации меченого вещества, в данном случае
30 это Анти-PD1. Кроме визуальной оценки иммунопозитивного окрашивания типов и структур клеток, использовали специализированную программу для анализа изображений Image J. В данной программе измеряли уровень иммунопозитивного окрашивания в выделенном интересующем участке. В зависимости от интенсивности окрашивания и общего количества окрашенных структур присваивали баллы по шкале
35 0-3. Итоговую оценку иммунопозитивного окрашивания проводили с учетом интенсивности окрашивания ткани, на которую наносили контрольные изотопические антитела.

Пример 19

Оценка эффективности анти-PD1 антитела *in vivo*

40 Для оценки эффективности использовали гуманизированных РВМС мышей (The Jackson Laboratory), которым подкожно прививали опухолевую линию меланомы человека A2058. Каждое животное в группе получало $2,5 \times 10^6$ опухолевых клеток. Перед введением клетки смешивали с Matrigel® в соотношении 1:1. Полученную смесь вводили подкожно. Оценка эффективности проводили с использованием трех доз препарата
45 BCD-100, препарата сравнения Keytruda® (положительный контроль) и препарата нормального иммуноглобулина человека для внутривенного введения (отрицательный контроль) (Таблица 1).

Таблица 1. Схема оценки эффективности препарата

Group	Number of mice	Test article	Days	Route of administration	Dose, mg/kg
1	6 (♂)	BCD-100	7, 10, 13, 16 19, 22, 25, 28 and 31	i.p.	5
2	6 (♂)	BCD-100			20
3	6 (♂)	BCD-100			40
4	6 (♂)	Keytruda® (Pembrolizumab) Positive control			40
5	6 (♂)	Mg Vehicle control			40

В ходе эксперимента оценивали вес животных (до введения, и далее два раза в неделю), объем опухолевого узла, использовали следующую формулу:

$$W^2 \times L \times 0.536,$$

где W - ширина опухолевого узла, L - длина опухолевого узла.

Животные подвергались эвтаназии на 37 сутки эксперимента, до момента эвтаназии проводился забор крови для оценки уровня циркулирующих лимфоцитов человеческой крови следующих субпопуляций:

CD45+ CD20+

B-lymphocytes

CD45+ CD3+

T-lymphocytes

CD45+ CD3+ CD4+

T-helper cells

CD45+ CD3+ CD8+

Cytotoxic T cells

CD45+ CD3- CD(16+56)+

NK-cells

Пример 20

Оценка токсикокинетики анти-PD1 антител

Исследование токсикокинетики проводили на яванских макаках (циномолгус). При проведении исследования использовали три уровня доз препарата BCD-100. Схема экспериментальных групп представлена в Таблице 2.

Таблица 2. Схема исследования токсикокинетики

Номер группы	Кол-во животных	Препарат	Способ введения	Доза, мг/кг
1	3 (♂)	МАТ против PD-1	внутривенно	10
2	3 (♂)	МАТ против PD-1		70
3	3 (♂)	МАТ против PD-1		140
4	3 (♂)	Плацебо		-

В ходе проведения исследования оценивали следующие параметры:

- результаты клинического осмотра;

- вес животных (до введения, на 4, 8, 22, 42 сутки эксперимента);
- температуру тела (до введения, через 1, 2, 4, 6, 24 часа после введения, на 4, 8, 22, 42 сутки эксперимента);
- общий анализ мочи (до введения, на 4, 8, 22, 42 сутки эксперимента);
- 5 - общий анализ крови по показателям: количество эритроцитов, количество лейкоцитов, концентрация гемоглобина (до введения, на 4, 8, 22, 42 сутки эксперимента);
- биохимический анализ сыворотки крови по показателям: лактатдегидрогеназа, билирубин общий, общий белок, глюкоза, аспаратаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза (до введения, на 4, 8, 22, 42 сутки эксперимента);
- 10 - исследование концентрации препарата в сыворотке крови приматов (через 5 мин, 15 мин, 0,5, 1, 3, 6, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 264, 336, 408, 576, 888, 984 часов после введения).

Пример 21

Оценка токсичности при многократном внутривенном введении яванским макакам в течение трех месяцев с последующим периодом свободным от введения в течение 3 месяцев

Исследование токсичности при многократном внутривенном введении в течение 3 месяцев с последующим трехмесячным периодом восстановления проводили на релевантном виде животных - яванских макаках. В эксперименте использовали три

уровня доз. Схема экспериментальных групп представлена в Таблице 3.

Таблица 3. Схема оценки токсичности при многократном внутривенном введении

Номер группы	Кол-во животных	Препарат	Способ введения	Доза
1	3 (♂)	МАТ против PD1	в/в	5,0мг/кг
	3 (♀)			
2	3 (♂)	МАТ против PD1		30,0мг/кг
	3 (♀)			
3	3 (♂) *	МАТ против PD1		70,0мг/кг
	3 (♀) *			
	3 (♂)			
	3 (♀)			
4	3 (♂)	Плацебо		-
	3 (♀)			

В ходе проведения исследования оценивали следующие параметры:

- результаты клинического осмотра;
- вес животных (до введения далее на 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 13 неделях эксперимента);
- температуру тела (до введения, далее еженедельно до окончания эксперимента);
- влияние на сердечно-сосудистую систему, для чего оценивали биоэлектрическую
- 45 активность сердца с использованием кардиографа «Поли-Спектр», оценку проводили до введения препарата и далее на 5, 9, 13, 18, 22, 26 неделях эксперимента;
- общий анализ мочи (до введения, на 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 неделях эксперимента);
- общий анализ крови по показателям: количество эритроцитов, количество

лейкоцитов, концентрация гемоглобина, количество лимфоцитов, количество моноцитов, количество нейтрофилов, количество эозинофилов, количество базофилов, количество тромбоцитов (до введения, затем один раз в две недели, начиная с первой недели эксперимента);

5 - оценка влияния на свертывающую систему крови по показателям: активированное частичное тромбопластиновое время, концентрация фибриногена, протромбиновое время проводилась до введения препарата, далее в течение периода введения один раз в две недели, начиная со второй недели эксперимента, в течение периода восстановления на 15, 20 и 25 неделях;

10 - биохимический анализ сыворотки крови по показателям: натрий, калий, креатинин, мочеви́на, щелочная фосфатаза, лактатдегидрогеназа, билирубин общий, общий белок, глюкоза, триглицериды, аспартатаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза холестерин общий (до введения, на 4, 8, 12, 15, 20, 25 неделях эксперимента);

15 - на момент окончания периода введения проводили эвтаназию и последующее патоморфологическое исследование животных сателлитной группы 3*, на момент окончания исследования животных группы 3 и контрольной группы;

- в рамках проведения исследования токсичности оценивали также местно-раздражающее действие препаратов, для чего выделяли и проводили гистологическое исследование мягких тканей в месте введения препарата.

20 **Пример 22**

Исследование иммунотоксического действия препарата анти-PD1 антител

Исследование иммунотоксичности при многократном внутривенном введении в течение 3 месяцев с последующим трехмесячным периодом восстановления проводили на релевантном виде животных - яванских макаках. В эксперименте использовали три
25 уровня доз. Схема экспериментальных групп представлена в Таблице 4.

Таблица 4. Схема исследования иммунотоксичности при многократном внутривенном введении

30

Номер группы	Кол-во животных	Препарат	Способ введения	Доза
1	3 (♂)	МАТ против PD-1	в/в	5,0мг/кг
	3 (♀)			
2	3 (♂)	МАТ против PD-1		30,0мг/кг
	3 (♀)			
3	3 (♂)	МАТ против PD-1		70,0мг/кг

35

40

	3 (♀)		
4	3 (♂)	Плацебо	-
	3 (♀)		

В ходе проведения исследования оценивали следующие параметры:

45 - субпопуляционный состав лимфоцитов, оценивали до введения препарата затем на 3, 7, 13, 21 и 26 неделях эксперимента;

- соотношение классов иммуноглобулинов, оценивали до введения на 4, 8, 12, 20, 25 неделях эксперимента;

- влияние на фагоцитоз оценивали до введения и далее на 3, 7, 13, 21, 26 неделях эксперимента;
- реакцию бласттрансформации лимфоцитов ставили до введения препарата и далее на 5, 13, 21, 26 неделях эксперимента.

Пример 23

Оценка фармакокинетики и иммуногенности при многократном внутривенном введении анти PD-1 антител

Исследование фармакокинетики и иммуногенности при многократном внутривенном введении в течение 3 месяцев с последующим трехмесячным периодом восстановления проводили на релевантном виде животных - яванских макаках. В эксперименте использовали три уровня доз. Схема экспериментальных групп представлена в Таблице 5.

Таблица 5. Схема оценки фармакокинетики и иммуногенности при многократном внутривенном введении

Номер группы	Кол-во животных	Препарат	Способ введения	Доза		
1	3 (♂)	МАТ против PD-1	в/в	5,0 мг/кг		
	3 (♀)					
2	3 (♂)	МАТ против PD-1		в/в	30,0 мг/кг	
	3 (♀)					
3	3 (♂)	МАТ против PD-1			в/в	70,0 мг/кг
	3 (♀)					

Для оценки динамики концентрации препарата и последующего расчета фармакокинетических показателей использовали сыворотку крови животных взятую до введения препарата и далее на 1, 2, 8, 9, 15, 16, 22, 23, 29, 30, 36, 37, 43, 44, 50, 51, 57, 58, 64, 65, 71, 72, 78, 79, 85, 86, 92, 99, 106, 113, 120, 127, 134, 148, 162, 176 сутки эксперимента.

Оценку иммуногенности проводили по уровню связывающих антител, для чего отбирали кровь и отделяли сыворотку до введения препарата и далее на 4, 8, 12, 20, 26 неделях эксперимента.

(57) Формула изобретения

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с рецептором PD-1 человека, и включает:

- 1) вариабельный домен тяжелой цепи, который содержит аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3 (CDR1-CDR3),
- 2) вариабельный домен легкой цепи, который содержит аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6 (CDR1-CDR3).

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где вариабельный домен тяжелой цепи представляет собой аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где вариабельный домен легкой цепи представляет собой аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где

1) вариабельный домен тяжелой цепи представляет собой аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7;

2) вариабельный домен легкой цепи представляет собой аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8.

5. Антитело по п. 1, включающее:

1) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9;

2) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где связывающий домен гуманизирован.

7. Антитело по п. 1, характеризующееся тем, что оно относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека.

8. Антитело по п. 1, где Fc константная часть содержит любые мутации, понижающие или устраняющие любую из эффекторных функций ADCC, ADCP или CDC в сравнении с природной последовательностью.

9. Антитело по п. 1, где Fc константная часть содержит мутации, увеличивающие значение фармакинетических параметров в животном или человеке, такие как $t_{1/2\beta}$ (час) или C_{\max} (мкг/мл).

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, характеризующееся тем, что имеет по меньшей мере одно из следующих свойств:

a) имеет такую агрегационную стабильность, что при концентрациях более 10 мг/мл и хранении при $T=4^{\circ}\text{C}$ в течение более чем 6 месяцев содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5% от исходного содержания в растворе;

b) имеет такую агрегационную стабильность, что при концентрациях более 10 мг/мл и при повышении температуры до 37°C в течение более чем 2 недель содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5% от исходного содержания в растворе;

c) имеет такую агрегационную стабильность, что при концентрациях более 10 мг/мл и повышении температуры до 50°C в течение более чем 6 часов содержание агрегатов не увеличивается более чем на 5% от исходного содержания в растворе;

d) имеет константу диссоциации при связывании с PD-1 человека K_D не более 10^{-9} (M);

e) имеет кинетическую константу ассоциации при связывании с PD-1 человека $k_{on}(1/\text{Ms})$ не менее 10^5 (1/Mc);

f) имеет кинетическую константу диссоциации при связывании с PD-1 человека $\text{dis}(1/\text{s})$ не более 10^{-4} (1/c).

11. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий домен по любому из пп. 1-10.

12. Экспрессионный вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 11.

13. Клетка-хозяин для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по пп. 1-10, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 11.

14. Способ получения клетки-хозяина по п. 13, который включает трансфекцию подходящей исходной клетки экспрессионным вектором по п. 12.

15. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-10, включающий стадии: получение клетки-хозяина по п. 13, культивирование

клетки-хозяина в условиях, достаточных для получения указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, с последующим выделением и очисткой полученного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

5 16. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или нарушения, которые связаны с активностью PD1, у субъекта, нуждающегося в таком лечении, содержащая в терапевтически эффективном количестве антитело или его антигенсвязывающего фрагмента по пп. 1-10 в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями.

10 17. Фармацевтическая композиция по п. 16, предназначенная для лечения онкологических или инфекционных заболеваний.

18. Способ ингибирования биологической активности PD-1 у субъекта, нуждающегося в таком ингибировании, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-10.

15 19. Способ лечения заболевания или нарушения, которые связаны с активностью PD-1, у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающий введение пациенту в терапевтически эффективном количестве антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-10 или фармацевтической композиции по пп. 16-17.

20

25

30

35

40

45

1

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**SEQ ID NO 1**

FTFSSYWMY

SEQ ID NO 2

AIDTGGGRITYYADSVKG

SEQ ID NO 3

CARDEGGGTGWGVLDWPYGLDA

SEQ ID NO 4

GGNNIGSKNVH

SEQ ID NO 5

RDSNRPS

SEQ ID NO 6

CQVWDSSTAV

SEQ ID NO 7

10	20	30	40
QVQLVQSGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	SYWMYWVRQV
50	60	70	80
PGKGLEWVSA	IDTGGGRITYY	ADSVKGRFAI	SRVNAKNTMY
90	100	110	120
LQMNSLRAED	TAVYYCARDE	GGGTGWGVLK	DWPYGLDAWG
QGTLVTVSS			

SEQ ID NO 8

10	20	30	40
QPVLTQPLSV	SVALGQTARI	TCGGNNIGSK	NVHWYQQKPG
50	60	70	80
QAPVLVIYRD	SNRPSGIPER	FSGSNSGNTA	TLTISRAQAG
90	100		
DEADYYCQVW	DSSTAVFGTG	TKLTVLQ	

SEQ ID NO 9

10	20	30	40
QVQLVQSGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	SYWMYWVRQV

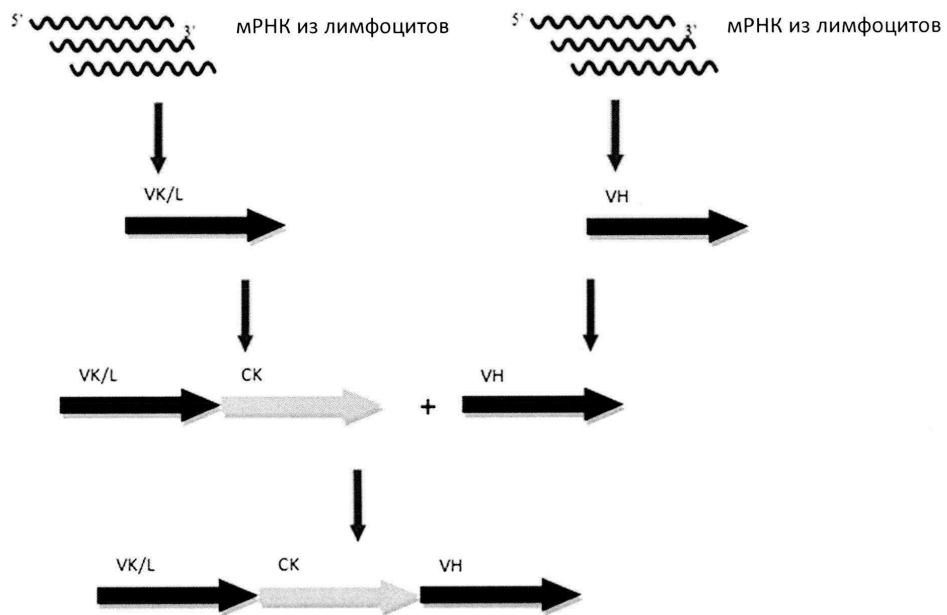
2

50 60 70 80
 PGKGLEWVSA IDTGGGRYY ADSVKGRFAI SRVNAKNTMY
 90 100 110 120
 LQMNSLRAED TAVYYCARDE GGGTGWGVLK DWPYGLDAWG
 130 140 150 160 170
 QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW
 180 190 200 210 220
 NSGALTSGVH TFPVQLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN
 230 240 250 260 270
 TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE
 280 290 300 310
 VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
 320 330 340 350
 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
 360 370 380 390
 YTLPPSREEM AKGQPREPQV TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
 400 410 420 430
 VEWESNGQPE NNYKTPPV L DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
 440 450
 QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

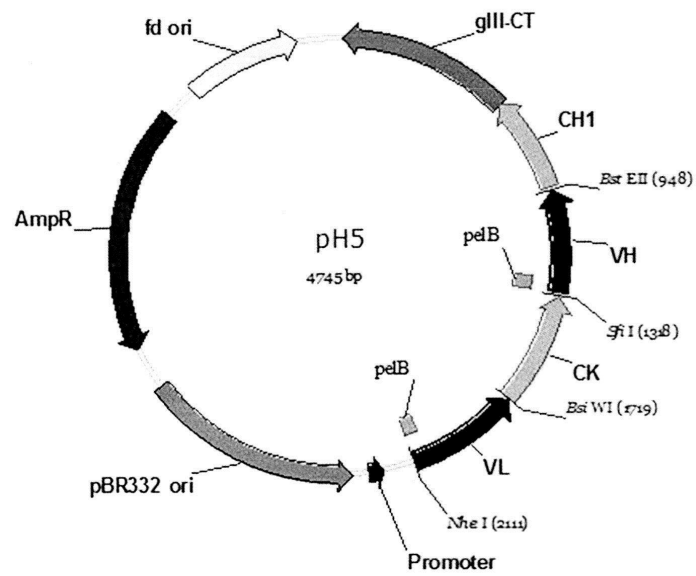
SEQ ID NO 10

10 20 30 40
 QPVLTPQLSV SVALGQTARI TCGGNNIGSK NVHWYQQKPG
 50 60 70 80
 QAPVLVIYRD SNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRAQAG
 90 100 110 120
 DEADYYCQVW DSSTAVFGTG TKLTVLQRTV AAPSVFIFPP
 130 140 150 160
 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ

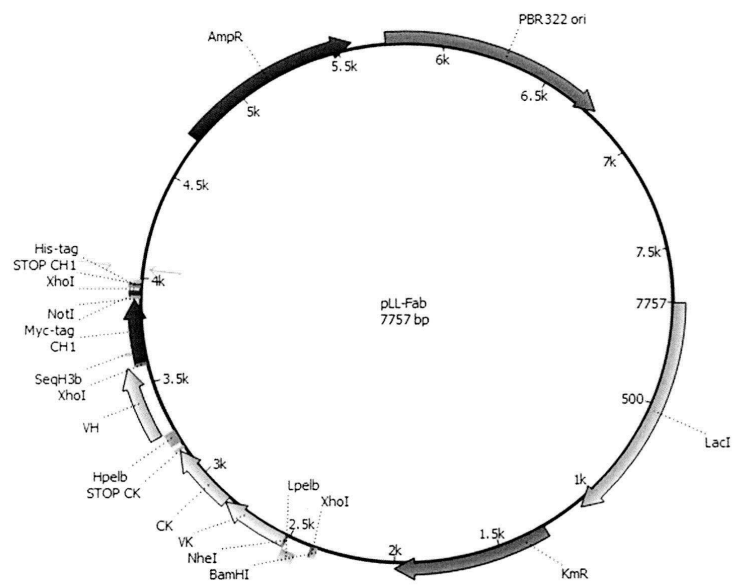
170 180 190 200
ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
210
LSSPVTKSFN RGEC



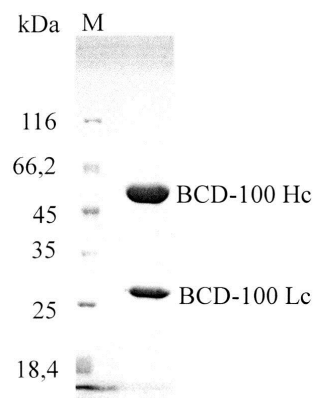
Фиг. 1



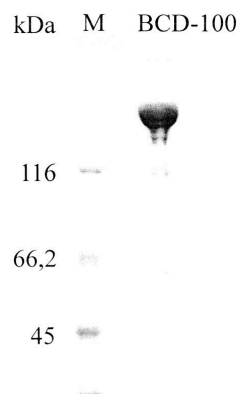
Фиг. 2 А



Фиг. 2 Б

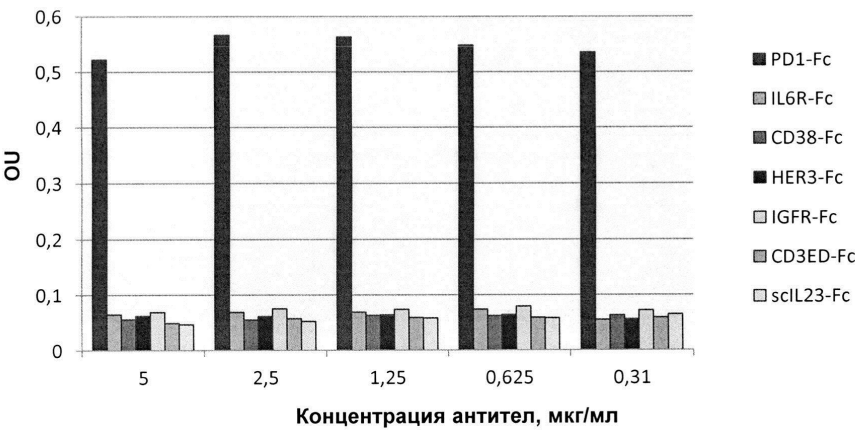


Фиг. 3А

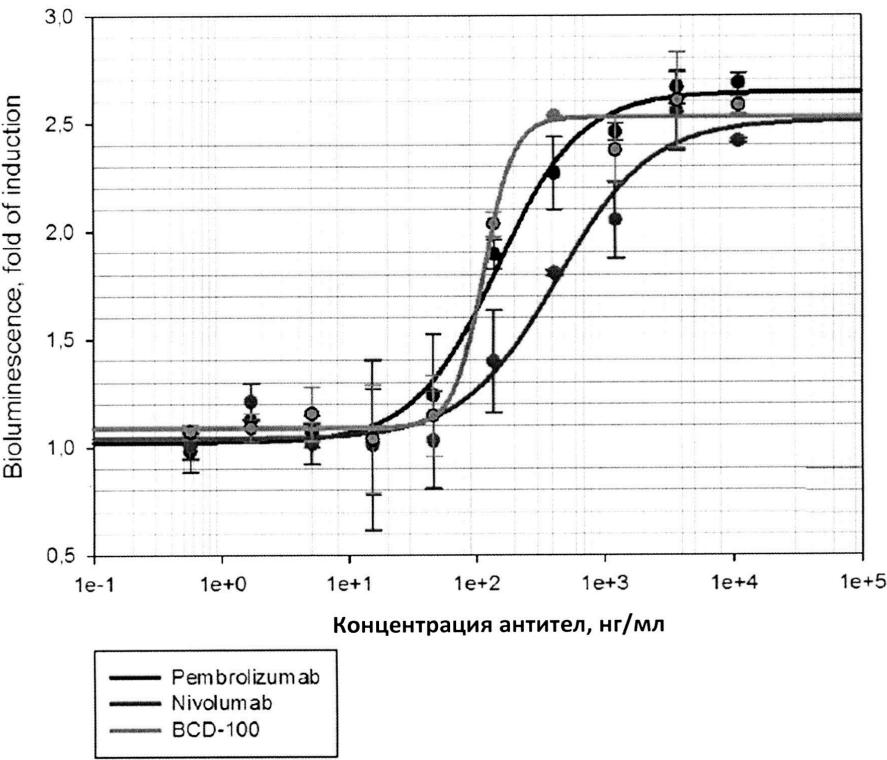


М – Fermentas, неокрашенный РW маркер

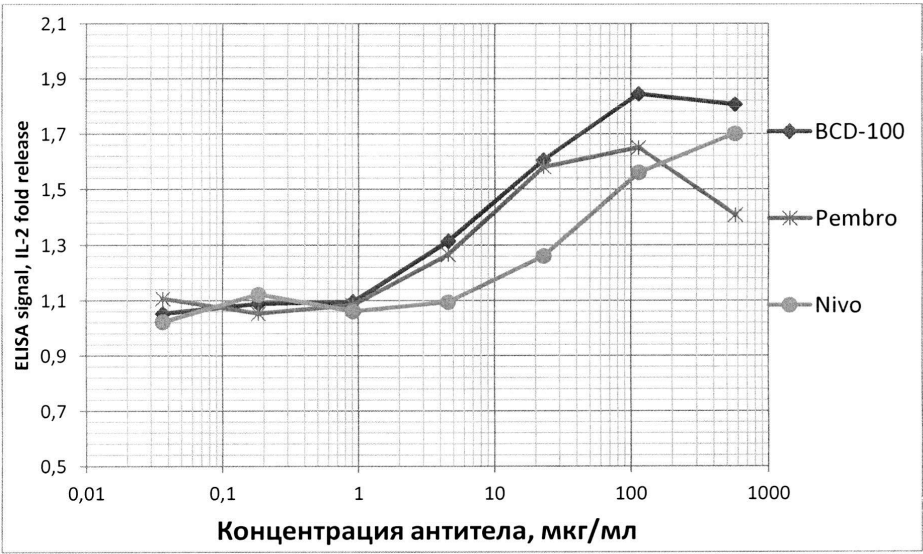
Фиг. 3Б



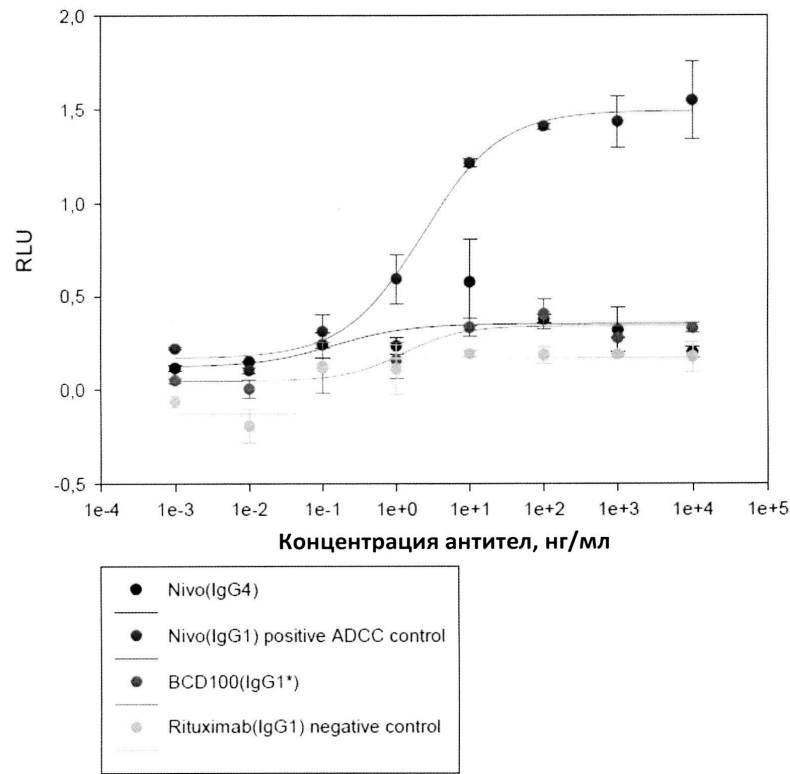
Фиг. 4



Фиг. 5



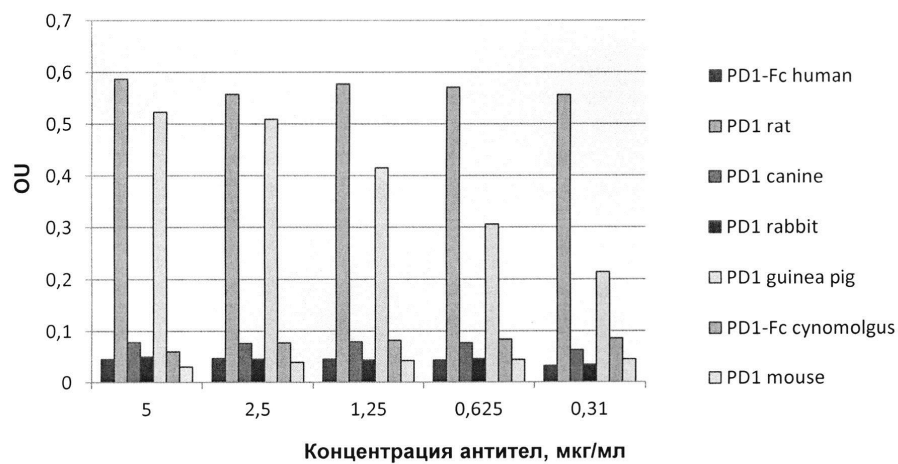
Фиг. 6



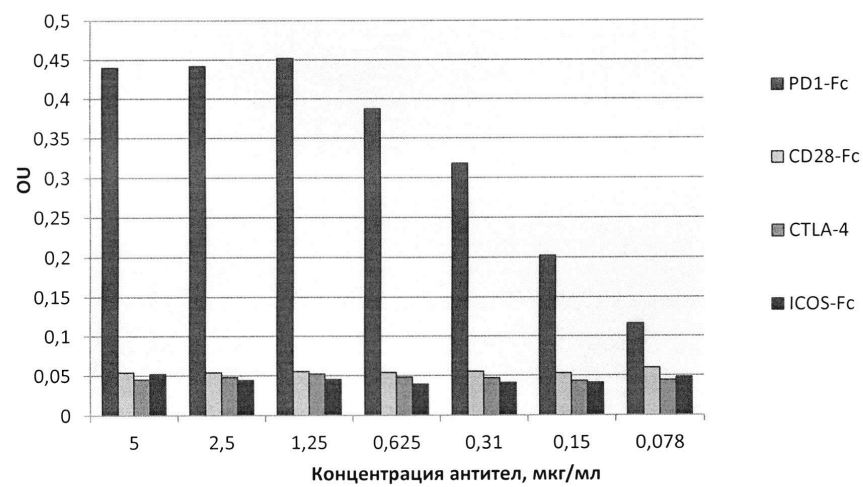
Фиг. 7

	FcRn KD, M	FcgRIa KD, M	FcgRIIIaV KD, M	FcgRIIIaH KD, M	FcgRIIIb KD, M
Nivolumab IgG4	9,52E-09±5,07E-10	6,40E-08 ±1.1E-08M	4,20E-06 ±5.4E-07M	1,60E-06 ±1.5E-07M	2,80E-07 ±2.2E-08M
Pembrolizumab IgG4	5,10E-09±3,21E-10	5,00E-08 ±7.9E-09M	5,00E-06±4.4E-07M	1,30E-06±1.6E-07M	2,30E-06±1.9E-07M
BCD-100 IgG1 *	9,60E-09±4,24E-10	7,50E-07 ±9.3E-08M	7,40E-07±1.1E-07M	NA	NA

Фиг. 8



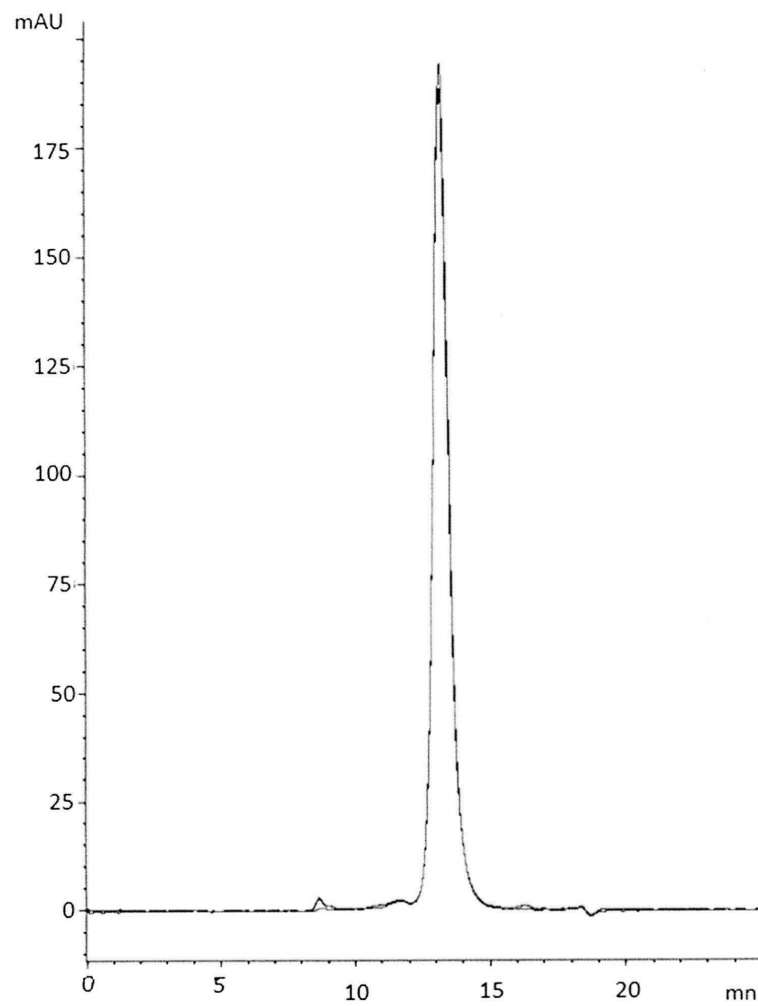
Фиг. 9



Фиг. 10

	PD1 человеческий KD, М	PD1 макаки KD, М
BCD-100 IgG1*	1,86E-10	<1.0E-12

Фиг. 11



Фиг. 12