

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/2818 (2024.08); A61K 39/395 (2024.08); A61P 35/00 (2024.08)

(21)(22) Заявка: 2024100349, 09.06.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
09.06.2022Дата регистрации:  
30.10.2024

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
11.06.2021 CN 202110654827.4

(43) Дата публикации заявки: 17.01.2024 Бюл. № 2

(45) Опубликовано: 30.10.2024 Бюл. № 31

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 11.01.2024(86) Заявка РСТ:  
CN 2022/097854 (09.06.2022)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2022/258011 (15.12.2022)Адрес для переписки:  
101000, г. Москва, ул. Мясницкая, дом  
13, строение 5, Фелицына Светлана Борисовна

(72) Автор(ы):

ХО, Юнтин (CN),  
ФУ, Цзюнь (CN),  
ЛУ, Ди (CN),  
ЧЖАН, Чжэ (CN),  
ЛУ, Лишэн (CN),  
ЛИ, Фань (CN),  
ГУН, Чуньси (CN)

(73) Патентообладатель(и):

ГУАНДУН ФАПОН БИОФАРМА ИНК.  
(CN)(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: WO 2010029434 A1, 18.03.2010. US  
2017044259 A1, 16.02.2017. HUI ZHOU et al.,  
Safety and Efficacy of Anti-PD-1 Monoclonal  
Antibodies in Patients With Relapsed or  
Refractory Lymphoma: A Meta-Analysis of  
Prospective Clinic Trails, Front Pharmacol, 2019;  
10: 387. MINGZHU WANG et al., Identification  
of a monoclonal antibody that targets PD-1 in a  
(см. прод.)(54) ГУМАНИЗОВАННОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ PD-1 ИЛИ ЕГО АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ  
ФРАГМЕНТ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области  
биотехнологии, а именно к гуманизованному  
антителу против PD-1 и его  
антигенсвязывающему фрагменту, а также к  
композиции, его содержащей. Также раскрыты  
нуклеиновая кислота, кодирующаявышеуказанное антитело или его фрагмент, а  
также вектор и клетка, ее содержащие.  
Изобретение эффективно для лечения  
заболевания или состояния, опосредованного PD-  
1. 7 н. и 5 з.п. ф-лы, 5 ил., 12 табл., 16 пр.

(56) (продолжение):

manner requiring PD-1 Asn58 glycosylation, Communications Biology, 2019, volume 2, Article number: 392. RU  
2656181 C1, 31.05.2018.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C07K 16/2818* (2024.08); *A61K 39/395* (2024.08); *A61P 35/00* (2024.08)

(21)(22) Application: **2024100349, 09.06.2022**

(24) Effective date for property rights:  
**09.06.2022**

Registration date:  
**30.10.2024**

Priority:

(30) Convention priority:  
**11.06.2021 CN 202110654827.4**

(43) Application published: **17.01.2024 Bull. № 2**

(45) Date of publication: **30.10.2024 Bull. № 31**

(85) Commencement of national phase: **11.01.2024**

(86) PCT application:  
**CN 2022/097854 (09.06.2022)**

(87) PCT publication:  
**WO 2022/258011 (15.12.2022)**

Mail address:  
**101000, g. Moskva, ul. Myasnitskaya, dom  
13, stroenie 5, Felitsyna Svetlana Borisovna**

(72) Inventor(s):

**HUO, Yongting (CN),  
FU, Jun (CN),  
LU, Di (CN),  
ZHANG, Zhe (CN),  
LU, Lisheng (CN),  
LI, Fan (CN),  
GONG, Chunxi (CN)**

(73) Proprietor(s):

**GUANGDONG FAPON BIOPHARMA INC.  
(CN)**

(54) **HUMANIZED ANTI-PD-1 ANTIBODY OR ANTIGEN-BINDING FRAGMENT THEREOF AND USE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, namely to a humanized anti-PD-1 antibody and its antigen-binding fragment, as well as to a composition containing same. Also disclosed is a nucleic acid coding

said antibody or its fragment, as well as a vector and a cell containing it.

EFFECT: invention is effective for treating a PD-1 mediated disease or condition.

12 cl, 5 dwg, 12 tbl, 16 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Данная заявка относится к области биомедицинской технологии. Более конкретно, она касается гуманизованного антитела против PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента и их применения.

Уровень техники

Фактор запрограммированной смерти-1 (PD1) является представителем семейства CD28 и экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках. PD1 человека кодируется геном *Pdcd1*, расположенным на участке 2q37.3, имеет общую длину 9,6 т.н., состоит из 5 экзонов и 4 интронов и содержит промотор в 663 п.н. перед ним. PD1 представляет собой трансмембранный белок I-го типа в 55 кДа. Его молекулярная структура состоит из внеклеточной области, трансмембранной области и внутриклеточной области. Внеклеточная область содержит один варибельный домен иммуноглобулина (IgV), а внутриклеточная область содержит ингибирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITIM) и мотив переключения иммунорецептора на основе тирозина (ITSM). Аминокислотная последовательность внеклеточной области PD-1 на 24% гомологична последовательности CTLA-4 и на 28% гомологична CD28. После активации Т-клеток PD-1 в основном собирает тирозиновые фосфолипазы SHP2 через ITIM, что ведет к дефосфорилированию нижележащих эффекторных молекул.

PD-1 имеет два лиганда: PD-L1 и PD-L2. Оба они являются гомологами B7. Ген PDL расположен на участке 9P24.2 хромосом человека и имеет длину в 42 т.н. И PD-L1, и PD-L2 имеют молекулярную структуру, содержащую один домен типа варибельного домена иммуноглобулина, один домен типа константной области, одну трансмембранную область и один короткий цитоплазматический хвост.

PD-1 при связывании с PD-L1 и PD-L2 может подавлять активацию Т-клеток. PD-L1 экспрессируется на поверхности различных опухолевых клеток, в том числе рака легких, рака желудка, рака печени, рака пищевода, рака почек, рака яичников, рака шейки матки, рака молочной железы, рака кожи, рака толстой кишки, рака мочевого пузыря, глиального рака, рака головы и шеи и плоскоклеточной карциномы полости рта. Кроме того, на периферии этих раковых опухолей обнаруживается большое количество Т-клеток CD8<sup>+</sup>, экспрессирующих PD-L1. Статистика клинических результатов показывает, что высокий уровень экспрессии PD-L1 на опухолевых клетках связан с плохим прогнозом у больных раком.

Сущность изобретения

Техническая проблема, которую должна решить заявка, заключается в преодолении дефектов и недостатков существующих антител с низкой аффинностью связывания и низкой специфичностью к PD-1 путем получения гуманизованного антитела против PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента и их применения.

Целью данной заявки является получение гуманизованного антитела против PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента. Антитело включает область CDR легкой цепи и область CDR тяжелой цепи. Область CDR тяжелой цепи состоит из HCDR1, HCDR2 и HCDR3. Область CDR легкой цепи состоит из LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представлены последовательно в SEQIDNO: 8-10, а аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представлены последовательно в SEQIDNO: 11-13. Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела представлена в любой из SEQIDNO:3-5.

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела представлена в любой из SEQIDNO:6-7.

Заявка также касается нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или фармацевтической композиции, относящейся к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту.

Заявка также касается применения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и соответствующей им нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или фармацевтической композиции при получении лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, опосредованных PD-1.

Заявка также касается способа лечения опосредованных PD-1 заболевания или состояния, который включает введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, вектора, клеток или фармацевтической композиции.

Заявка также касается антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, вектора, клеток или фармацевтической композиции для лечения.

Заявка также касается антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, вектора, клеток или фармацевтической композиции для лечения опосредованных PD-1 заболевания или состояния.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлен график, показывающий влияние различных концентраций PD-1-112-C2 на секрецию ИЛ-2/ИНФ- $\gamma$ .

На фиг. 2 представлен график, показывающий влияние различных концентраций PD-1-112-C2 на пролиферацию Т-клеток и секрецию ими цитокина ИЛ-2.

На фиг. 3 представлен график, показывающий влияние различных концентраций PD-1-112-C2 на пролиферацию Т-клеток и секрецию ими цитокина ИНФ- $\gamma$ .

На фиг. 4 представлен график, показывающий влияние гуманизованного антитела с53 против PD-1 на объем опухолей.

На фиг. 5 представлен график, показывающий влияние гуманизованного антитела с53 против PD-1 на выживаемость мышей.

Раскрытие сущности изобретения

Далее настоящее изобретение будет объяснено на конкретных примерах, но эти примеры не ограничивают настоящее изобретение никоим образом. Если не указано иначе, реагенты, методы и устройства, используемые в заявке, представляют собой стандартные для данной области техники реагенты, методы и устройства.

Если не указано иначе, реагенты и материалы, используемые в следующих примерах, коммерчески доступны.

Данная заявка касается гуманизованного антитела против PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента. Антитело включает области CDR легкой цепи и области CDR тяжелой цепи. Области CDR тяжелой цепи состоят из HCDR1, HCDR2 и HCDR3. Области CDR легкой цепи состоят из LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представлены последовательно в SEQIDNO: 8-10, а аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представлены последовательно в SEQIDNO: 11-13. Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела представлена в любой из SEQIDNO: 3-5. Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела представлена в любой из SEQIDNO: 6-7.

В данной заявке области CDR идентифицируют по системе нумерации Кабата, но области CDR, идентифицированные другими способами, также входят в заявленный объем заявки.

В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 3, а аминокислотная

последовательность варибельной области легкой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 6, или же аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 4, а аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 7, или же аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 5, а аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 7.

В некоторых воплощениях антитело содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, причем константная область тяжелой цепи представляет собой любой один или несколько из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE или IgM; а константная область легкой цепи представляет собой  $\kappa$ - или  $\lambda$ -цепь.

В некоторых воплощениях вид источника константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи выбран из человека, мыши или обезьяны.

В некоторых воплощениях антитело представляет собой химерное антитело или полиспецифичное антитело (например, биспецифичное антитело).

В данной заявке термин “полиспецифичное антитело” означает такой антигенсвязывающий белок или такое антитело, которое нацелено более чем на один антиген или эпитоп.

В данной заявке термин “биспецифичное антитело” означает полиспецифичный антигенсвязывающий белок или полиспецифичное антитело, которые могут быть получены различными способами, включая, без ограничения, слияние гибридом или соединение Fab'-фрагментов. Например, см. Songsivilai and Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553. Два сайта связывания биспецифичного антигенсвязывающего белка или антитела должны связываться с двумя разными эпитопами, присутствующими на одном и том же или на разных белках-мишенях.

В данной заявке термин “специфическое связывание” и подобные выражения относятся к связыванию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с эпитопом заданного антигена. Обычно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с аффинностью ( $K_D$ ) примерно менее  $10^{-6}$  М, например, примерно менее  $10^{-7}$  М,  $10^{-8}$  М,  $10^{-9}$  М или  $10^{-10}$  М либо меньше.  $K_D$  означает соотношение скорости диссоциации и скорости ассоциации ( $k_{off}/k_{on}$ ), величина которых может быть измерена методом, известным специалистам в данной области.

В некоторых воплощениях антигенсвязывающий фрагмент представляет собой любой один или несколько из  $F(ab')_2$ , Fab, scFv, Fv и однодоменных антител.

В данной заявке термин “ $F(ab')_2$ ” охватывает две легкие цепи и две тяжелые цепи, которые содержат часть константной области между доменами  $CH_1$  и  $CH_2$ , образуя межцепочечную дисульфидную связь между двумя тяжелыми цепями. Таким образом, фрагмент  $F(ab')_2$  состоит из двух Fab'-фрагментов, удерживаемых вместе дисульфидной связью между двумя тяжелыми цепями.

В данной заявке термин “Fab” охватывает одну легкую цепь, участок  $CH_1$  и варибельную область одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи.

В данной заявке термин “scFv” означает такую молекулу Fv, в которой варибельные области тяжелой и легкой цепи соединяются гибким линкером с образованием единой полипептидной цепи (которая образует антигенсвязывающую область) (например, см.,

Birdetal., Science, 242:423-426 (1988); и Hustonet al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5879-5883 (1988)).

В данной заявке термин “Fv” охватывает переменные области тяжелой и легкой цепи, но не содержит константной области.

В данной заявке термин “однодоменное антитело” охватывает только одну переменную область тяжелой цепи ( $V_{HH}$ ) и два обычных участка  $CH_2$  и  $CH_3$ , но они не так легко связываются друг с другом, как искусственно созданное одноцепочечное антитело (scFv), и даже объединяются в блоки. Более важно то, что структура  $V_{HH}$ , клонированная и экспрессированная отдельно, обладает структурной стабильностью и антигенсвязывающей активностью, сравнимой с исходной тяжелой цепью антитела, и представляет собой наименьшую известную единицу, способную связываться с целевым антигеном.

Заявка также касается нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованное антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

В предпочтительном воплощении нуклеиновая кислота включает: первую нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и/или вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В данной заявке нуклеиновая кислота обычно представлена РНК или ДНК, причем молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, предпочтительно это двухцепочечная ДНК. Нуклеиновая кислота является “функционально связанной”, когда она находится в функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если промотор или энхансер влияет на транскрипцию кодирующей последовательности. ДНК предпочтительно используется тогда, когда нуклеиновая кислота лигирована в вектор. Более того, поскольку антитело является мембранным белком, то нуклеиновая кислота обычно несет последовательность сигнального пептида.

Заявка также касается вектора, несущего нуклеиновую кислоту.

В данной заявке термин “вектор” означает носитель нуклеиновой кислоты, в который может быть вставлен полинуклеотид. Если вектор может обеспечить экспрессию белка, кодируемого вставленным полинуклеотидом, такой вектор называется экспрессирующим вектором. Вектор может быть введен в клетки хозяина посредством трансформации, трансдукции или трансфекции с тем, чтобы элемент генетического материала, переносимый вектором, мог экспрессироваться в клетке-хозяине. Векторы хорошо известны специалистам в данной области, включают, без ограничения: плазмиды; фагемиды; космиды; искусственные хромосомы, к примеру, искусственные дрожжевые хромосомы (YAC), искусственные бактериальные хромосомы (BAC) или искусственные хромосомы, полученные из P1 (PAC); фаги, к примеру, фаг  $\lambda$  или M13, и вирусы животных и т.п. Вирусы животных, которые можно использовать в качестве вектора, включают, без ограничения, ретровирусы (в том числе и лентивирусы), аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, герпесвирусы (например, вирус простого герпеса), поксвирусы, бакуловирусы, папилломавирусы, паповавирусы (например, SV40).

Заявка также касается клеток, несущих нуклеиновую кислоту, содержащих вектор или способных экспрессировать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Заявка также касается фармацевтической композиции, включающей указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку.

В данной заявке термин “фармацевтическая композиция” означает такую форму, которая обеспечивает эффективную биологическую активность активного ингредиента и не содержит дополнительных ингредиентов, неприемлемо токсичных для субъекта, которому будет вводиться композиция.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель.

В данной заявке термин “фармацевтически приемлемый носитель” может охватывать всевозможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные средства и противогрибковые средства, вещества для изотонизации и замедляющие всасывание вещества и т.п., которые физиологически совместимы и применяются для увеличения срока годности или эффективности антителя.

Кроме того, применение указанных антителя или его антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или фармацевтической композиции при получении лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, опосредованного PD-1, также должно входить в заявленный объем этой заявки.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция или лекарственное средство находится в форме, подходящей для инъекций.

В предпочтительном воплощении фармацевтическая композиция или лекарственное средство находится в форме, подходящей для введения посредством подкожной инъекции, внутрикожной инъекции, внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции или инъекционное введение в очаг поражения.

Данная заявка имеет следующие полезные эффекты.

Гуманизированное антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в заявке, могут связываться с клетками CHO-hPD1, клетками CHO-супо и активированными РВМС с высокой аффинностью. У них значительно улучшена аффинность по сравнению с положительным контролем. Они могут эффективно и специфически связываться с PD-1 и эффективно блокировать связывание лигандов PD-L1/PD-L2 с CHO-hPD1. При MLR они могут блокировать связывание PD-1 с лигандами и ингибировать сигнальный путь PD-1, тем самым способствуя пролиферации Т-клеток и секреции цитокинов ИЛ-2 и ИНФ- $\gamma$ . Таким образом, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и соответствующая нуклеиновая кислота, вектор, клетки или фармацевтическая композиция имеют широкие перспективы для применения при получении лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, опосредованного PD-1.

## Примеры

### Пример 1. Получение антител против PD-1

#### 1. Иммуноген

Искусственно синтезировали последовательность PD-1 человека (NCBINP 005009) и использовали верхний праймер: 5'-CCGCAAGCTTGCCGCCACCATG-3' (SEQIDNO:1) и нижний праймер: 5'-CCGGAATTCTCATTAATGGTGATGGTGATGCTGGAACTGGCCGGCAGGTC-3' (SEQIDNO:2) для ПЦР-амплификации внеклеточного конца последовательности PD-1 человека. Затем внеклеточный конец отщепляли с помощью HindIII и EcoRI и клонировали в эукариотическую систему экспрессии pCDNA3.4A, получая плазмиду. Этой плазмидой трансфецировали клетки 293, собирали супернатант и проводили очистку, получая рекомбинантный белок PD-1 человека (hPD-1).

#### 2. Иммунизация животных

Смешивали 125 мкг рекомбинантного белка hPD-1 при концентрации 1,23 мг/мл в

качестве антигена с эквивалентным количеством адьюванта Фрейнда (Sigma-Aldrich F5881) в качестве иммунного адьюванта, отбирали пять 6-недельных мышей BALb/C и подвергали подкожной иммунизации, при этом количество вводимого антигена составляло 25 мкг на мышь. После первичной иммунизации раз в неделю проводили повторную (бустерную) иммунизацию при той же дозе. После в совокупности 5 иммунизаций определяли иммунный ответ путем сбора хвостовой крови у мышей. Проводили слияние при помощи FACS-скрининга (как описано ниже), используя мышей с достаточными титрами иммуноглобулина против hPD-1. Через 3 дня после внутрибрюшинной бустерной иммунизации антигеном мышей забивали и извлекали селезенку для слияния клеток.

### 3. Отбор мышей BALb/C, вырабатывающих антитела против hPD-1

Для отбора мышей BALb/C, вырабатывающих антитела против hPD-1, тестировали сыворотки иммунизированных мышей методом FACS. Разведения сыворотки мышей, иммунизированных рекомбинантным белком hPD-1, инкубировали с трансфицированными hPD1 клетками CHO при 4°C в течение 30 минут, промывали 3 раза ФСБ, а затем добавляли 0,4 мкг/мл козьего конъюгированного с фикоэритрином (PE) антитела против IgG мыши (Biolegend 405307) и инкубировали при 4°C в течение 30 минут. После 3-кратной промывки ФСБ образцы помещали в проточный цитометр фирмы BeckmanCoulter (CytoFLEXA00-1-1102) для проверки того, могут ли они связываться с клетками CHO, трансфицированными hPD1, и отбора мышей BALb/C, вырабатывающих антитела против hPD-1, а затем проводили слияние клеток.

### 4. Получение гибридом, вырабатывающих мышиные моноклональные антитела против hPD-1

Спленциты из иммунизированных мышей BALb/c сливали с клетками мышинной миеломы, а затем полученные гибридомы подвергали скринингу на наличие антигенспецифичных антител. Суспензии отдельных клеток из спленцитов иммунизированных мышей подвергали слиянию с одной пятой клеток мышинной миеломы (SP2/0, ATCC CRL1581), не секретирующих иммуноглобулины, с помощью PEG 1500 (Roche 10783641001). Слившиеся клетки высевали в 96-луночный планшет для культивирования клеток примерно по  $1 \times 10^5$  клеток на лунку, помещали планшет в инкубатор (Panasonic MCO-18AIC) и проводили культивирование при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Затем проводили культивирование в селективной среде HAT, то есть среде 1640, содержащей два антибиотика: пенициллин и стрептомицин (Gibco 15140122), 1xHAT (Sigma CRLP-7185) и 20% фетальной телячьей сыворотки (Royacel RY-F11-01), в течение 1 недели. Через 1 неделю среду HAT заменяли средой HT (среда 1640, содержащая два антибиотика: пенициллин и стрептомицин (Gibco 15140122), 1xHT (Gibco 11067030) и 20% фетальной телячьей сыворотки (Royacel RY-F11-01) для культивирования, а затем тестировали супернатанты клеточных культур из планшета со слияниями методом FACS для отбора гибридом, секретирующих антитела, способные связываться с белком hPD-1. Гибридомы, секретирующие антитела, способные связываться с белком hPD-1, пересеивали и снова подвергали скринингу. Гибридомы с положительными результатами скрининга на антитела, связывающиеся с белком hPD-1, субклонировали по меньшей мере дважды методом предельного разведения. Затем культивировали стабильные субклоны *in vitro* и получали небольшое количество антител для дальнейшего анализа. Клон гибридомы PD1-112-C2 был выбран для дальнейшего анализа.

Пример 2. Характеристика аффинности мышинового моноклонального антитела против PD-1

Стандартными методами получали клеточную линию CHO (клетки яичников

китайского хомячка) (CHO-hPD1), экспрессирующую рекомбинантный PD-1 человека на поверхности клеток, клеточную линию CHO (CHO-супоPD1), экспрессирующую PD-1 обезьяны (Uniprot: B0LAJ2) на поверхности клеток, и клеточную линию CHO (CHO-mousePD1), экспрессирующую PD-1 мыши (Uniprot: Q02242) на поверхности клеток, по рекомбинантной технологии. Эти линии клеток будут использоваться при проточной цитометрии (FCM) для определения характеристик связывания мышиног

моноклонального антитела PD-1-112C2 против PD-1.

Для оценки связывания мышиног моноклонального антитела против PD-1 с клетками CHO-hPD1 в 96-луночный планшет вносили по  $2 \times 10^5$  клеток CHO-hPD1 и добавляли серийные разведения мышиног моноклонального антитела против PD-1 (3-кратные серийные разведения при начальной концентрации 10 мкг/мл) и инкубировали при 4°C в течение 30 минут. Клетки 1 раз промывали буфером (ФСЮ, содержащим 3% БСА), а затем добавляли меченное PE флуоресцентное вторичное антитело против IgG мыши (Fc) Ab (Biolegend), инкубировали при 4°C в течение 30 минут, после чего промывали 1 раз буфером и ресуспендировали в ФСБ. После этого суспензии клеток подвергали анализу методом проточной цитометрии на CytoFlex (проточном цитометре Beckman) и измеряли количество антител, связавшихся с клетками, по средней интенсивности флуоресценции (MFI) окрашивания. Такой же метод применяли для оценки связывания мышиног моноклонального антитела против PD-1 с клетками CHO-супо и с клетками CHO-mousePD1 (иногда в заявке они сокращенно называются “CHO-mPD1”).

Результаты представлены в таблице 1. Эти данные показывают, что каждое мышиног моноклональное антитело PD-1-112-C2 против PD-1 способно связываться с высокой аффинностью как с клетками CHO-hPD1, так и с клетками CHO-супо; тогда как все мышинные моноклональные антитела не связывались с клетками CHO-mousePD1.

Таблица 1

Тестируемое антитело	FCM, EC <sub>50</sub> , нМ		
	CHO-hPD1	CHO-супоPD1	МКПК(активированные)
PD-1-112-C2	0,739	0,463	0,109

### Пример 3. Связывание антитела против PD-1 с активированными РВМС

При стимуляции ФГА (Sigma) свежих мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК) активировались и пролиферировали лимфоциты, достигая наибольшего уровня по экспрессии PD1 на третий день, и поэтому их можно было использовать для эксперимента по связыванию антител к PD-1 с PD1, который экспрессировался естественным образом в активированных лимфоцитах.

После получения из свежей периферической крови человека центрифугированием в градиенте среды для разделения лимфатических клеток доводили МКПК до плотности  $1 \times 10^6$  клеток/мл и инокулировали в T75, а затем добавляли ФГА-L (Sigma) в конечной концентрации 1 мкг/мл для стимулирования пролиферации лимфоцитов. После инкубации при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 3 дней клеточную суспензию извлекали и центрифугировали. Супернатант отбрасывали, а осадок ресуспендировали в буфере (ФСБ, содержащий 3% БСА) и вносили в 96-луночный U-образный планшет по  $2 \times 10^5$  на лунку, а затем добавляли в общей сложности 10 серийных разведений антител против PD1 при 3-кратных серийных разведениях, начиная с 30 мкг/мл, инкубировали при 4°C в течение 30 минут и центрифугировали при 300 g в течение 5 минут. Клетки промывали 1 раз буфером, добавляли меченное PE флуоресцентное козье антитело против IgG человека

(Biolegend) и инкубировали при 4°C в течение 30 минут. Клетки центрифугировали и промывали один раз, а затем ресуспендировали в ФСБ и проводили анализ на проточном цитометре CytoFlex для определения количества антител, связавшихся с МКПК.

Результаты представлены в таблице 1, причем антитело против PD1 способно было связываться с активированными лимфоцитами с высокой аффинностью.

Пример 4. Специфичность связывания мышинового моноклонального антитела против PD1

Проводили связывание мышинового моноклонального антитела против PD1 с четырьмя различными белками, представителями семейства CD28, для проверки специфичности антитела при связывании с PD-1. По стандартному методу ELISA на планшете для ELISA иммобилизовали PD-1, CD28, CTLA-4 и ICOS (ACRO) при концентрации в 1 мкг/мл и добавляли мышинное моноклональное антитело против PD-1 человека в концентрации 10 мкг/мл. В качестве вторичного антитела использовали конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP) антитело против IgG мыши (Sigma). После проявления с помощью ТМБ и остановки реакции проводили считывание значений OD<sub>450</sub> на считывающем устройстве.

Результаты представлены в таблице 2. Каждое мышинное моноклональное антитело PD-1-112C2 против PD-1 было способно специфически связываться с PD-1, но не с другими представителями семейства CD28.

Таблица2

Тестируемое антитело	PD-1-hFc человека	CD28-hFc человека	ICOS-hFc человека	CTLA4-hFc человека
PD-1-112-C2	2,1213	0,0625	0,062	0,131

Пример 5. Определение аффинности мышинового моноклонального антитела против PD1 человека методом биослойной интерферометрии (BLI)

Определение аффинности на ForteBio (OctetQke). На биосенсор HISIK наносили рекомбинантный белок PD-1-his (ACRO) в концентрации 5 мкг/мл на 120 секунд, а затем заполненный сенсор уравнивали в стандартном буфере (ФСБТ, ФСБ + 0,02% Твин 20) в течение 120 секунд, после чего переносили сенсор в одно разведение мышинового моноклонального антитела против PD-1 и оставляли на 180 секунд для измерения скорости ассоциации, а затем переносили в стандартный буфер на 20 минут для измерения скорости диссоциации. Наконец, проводили анализ с использованием кинетической модели.

Результаты обработки данных представлены в таблице 3.

Таблица3

Тестируемое антитело	K <sub>on</sub> (1/М·с)	K <sub>dis</sub> (1/с)	K <sub>D</sub> (М)
Opdivo(ABA0333)	1,38E+06	3,63E-06	2,62E-12
PD-1-112-C2	7,32E+05	3,18E-05	4,35E-11

Пример 6. Блокирование связывания лиганда PD-L1/PD-L2 с CHO-hPD1 мышинным моноклональным антителом против PD-1

На проточном цитометре анализировали способность мышинового моноклонального антитела против PD-1 блокировать связывание лигандов с PD-1, стабильно экспрессированным на поверхности трансфецированных клеток CHO. Белки лигандов, используемые в эксперименте, представляли собой слитые белки рекомбинантного

внеклеточного сегмента PD-L1/PD-L2, соединенные с Fc-сегментом IgG человека: PD-L1-hFc (ACRO) и PD-L2-hFc (ACRO).

Клетки CHO-PD1 ресуспендировали в буфере (ФСБ, содержащем 3% БСА) и доводили до плотности  $2 \times 10^6$  клеток/мл. Суспензию клеток вносили в 96-луночный U-образный планшет по 100 мкл на лунку и центрифугировали при 300 g в течение 5 минут, а затем отбрасывали супернатант.

Последующий процесс можно разделить на два режима блокирования: режим 1, при котором в лунки, содержащие клетки, добавляли PD-L1-hFc/PD-L2-hFc в концентрации 3 мкг/мл, инкубировали при 4°C в течение 30 минут, а затем добавляли в общей сложности 10 серийных разведений мышиных моноклональных антител против PD-1 при 3-кратных серийных разведениях, начиная с 30 мкг/мл, и инкубировали при 4°C в течение 30 минут; и режим 2, при котором в лунки, содержащие клетки, добавляли в общей сложности 10 серийных разведений мышиных моноклональных антител против PD-1 при 3-кратных серийных разведениях, начиная с 30 мкг/мл, инкубировали при 4°C в течение 30 минут, а затем добавляли белок PD-L1-hFc/PD-L2-hFc в концентрации 3 мкг/мл и инкубировали при 4°C в течение 30 минут.

Клетки центрифугировали при 300 g в течение 5 минут, промывали 1 раз буфером, добавляли меченное PE флуоресцентное козье антитело против IgG человека (Biolegend) и инкубировали при 4°C в течение 30 минут. Клетки центрифугировали и промывали 1 раз, а затем ресуспендировали в ФСБ и проводили анализ на проточном цитометре CytoFlex для определения количества белка лиганда, связавшегося с клетками, и расчета значения IC<sub>50</sub> антитела к PD-1 при блокировании связывания.

Результаты представлены в таблице 4. Мышиное моноклональное антитело PD-1-112-C2 против PD-1 было способно эффективно блокировать связывание PD-L1/PD-L2 с клетками CHO-PD1 в обоих режимах.

Таблица 4

Тестируемое антитело	FCM, IC <sub>50</sub> , нМ			
	Блокирование связывания CHO-hPD1 с PD-L1		Блокирование связывания CHO-hPD1 с PD-L2	
	режим 1	режим 2	режим 1	режим 2
PD-1-112-C2	2,567	1,546	4,614	3,727

Пример 7. Влияние антитела против PD-1 на высвобождение цитокинов из стимулируемых SEB клеток МКПК

В этом примере определяли влияние на секрецию цитокинов в присутствии или в отсутствие антитела против PD-1 при стимуляции культивируемых в течение ночи мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) добавлением энтеротоксина BStaphylococcus aureus (SEB) в качестве суперантигена.

Свежие мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) ресуспендировали в среде X-VIVO 15 (LONZA), содержащей 10% БСА, а затем вносили в культуральную колбу T25 и инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи для культивирования. На следующий день отбирали суспендированные клетки, центрифугировали, а затем ресуспендировали в свежей среде X-VIVO (содержащей 10% БСА) и добавляли SEB в качестве суперантигена (ToxinTechnology) в конечной концентрации 200 нг/мл, а затем вносили в 96-луночный планшет по  $1 \times 10^5$  клеток на лунку и при этом добавляли

различные концентрации антител против PD-1. Кроме того, ставили две лунки с антителами для контроля на изотип (одна с антителом для контроля на изотип mIgG1 (Biolegend); другая с антителом для контроля на изотип hIgG4 (Biolegend)), а также контрольные лунки без антител. Через 3 дня из лунок отбирали образцы и измеряли уровни ИЛ-2/ИНФ- $\gamma$  с помощью набора IL2/ИНФ- $\gamma$  HumanUncoatedELISAKit (eBioscience).

Результаты по влиянию различных концентраций PD-1-112-C2 на секрецию ИЛ-2/ИНФ- $\gamma$  представлены на фиг. 1. Антитело против PD-1 улучшает секрецию ИЛ-2/ИНФ- $\gamma$  в зависимости от концентрации. Эти результаты показывают, что в МКПК при стимуляции SEB в качестве суперантигена антитело PD-1-112-C2 против PD-1 было способно еще больше усиливать секрецию цитокинов Т-клетками.

Пример 8. Влияние антитела против PD-1 на смешанную лимфоцитарную реакцию

При смешанной лимфоцитарной реакции (MLR) в присутствии или в отсутствие антитела против PD-1 может проявляться пролиферация Т-клеток и уровень цитокинов, секретируемых Т-клетками, характерный для ситуации, когда блокируется передача сигналов PD1.

Из свежих МКПК выделяли моноциты CD14<sup>+</sup> с помощью микрошариков с CD14 человека (Miltenyi), индуцировали их в присутствии ГМ-КСФ/ИЛ-4 в течение 6 дней, затем добавляли ФНО- $\alpha$  и индуцировали созревание клеток ДК через 3 дня. В день эксперимента очищали Т-клетки из МКПК с помощью набора для обогащения Т-клеток человека EasySep™ (StemCell). Смешивали  $1 \times 10^5$  Т-клеток с  $1 \times 10^4$  клеток ДК и проводили культивирование, а к смешанным клеткам добавляли различные серийные разведения антител против PD-1. Кроме того, ставили две лунки с антителами для контроля на изотип (одна с антителом для контроля на изотип mIgG1 (Biolegend); другая с антителом для контроля на изотип hIgG4 (Biolegend)), а также контрольные лунки без антител. Через 3 дня из смешанной культуры отбирали супернатанты и определяли ИЛ-2, а еще через 2 дня культивирования отбирали супернатанты и определяли ИНФ- $\gamma$ .

Результаты по влиянию различных концентраций PD-1-112-C2 на пролиферацию Т-клеток и секрецию цитокина ИЛ-2 Т-клетками представлены на фиг. 2. Результаты по влиянию различных концентраций PD-1-112-C2 на пролиферацию Т-клеток и секрецию цитокина ИНФ- $\gamma$  Т-клетками представлены на фиг. 3. Результаты на фиг. 2 и 3 показывают, что в эксперименте по MLR антитело PD-1-112-C2 против PD-1 способно было блокировать связывание PD1 с лигандом в зависимости от концентрации антитела и ингибировать сигнальный путь PD1, тем самым усиливая пролиферацию Т-клеток и стимулируя секрецию цитокинов ИЛ-2 и ИНФ- $\gamma$  Т-клетками.

Пример 9. Гуманизация мышинового моноклонального антитела против PD-1

Мышиное моноклональное антитело PD-1-112-C2 против PD-1, полученное выше (аминокислотные последовательности его HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представлены последовательно в SEQIDNO: 8-10, а аминокислотные последовательности его LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представлены последовательно в SEQIDNO: 11-13, последовательность вариабельной области его тяжелой цепи представлена в SEQIDNO: 14, а последовательность вариабельной области его легкой цепи представлена в SEQIDNO: 15), подвергали гуманизации, а конкретный метод заключался в следующем.

Искусственно синтезировали последовательность PD-1 человека (NCBINP 005009) и клонировали её в эукариотическую систему экспрессии pCDNA3.4A. Этой плазмидой трансфицировали клетки 293, собирали супернатанты и проводили очистку, получая рекомбинантный белок PD-1 человека. Полученным рекомбинантным белком PD-1 человека подкожно иммунизировали самок мышей BALb/C. Спленоциты от

иммунизированных мышей BALb/c сливали с клетками мышинной миеломы, а затем полученные гибридомы подвергали скринингу на наличие антигенспецифичных антител. Гибридомы с положительными результатами скрининга на антитела, связывающиеся с белком hPD-1, субклонировали по меньшей мере дважды методом предельного разведения, а затем культивировали стабильные субклоны *invitro* для получения небольшого количества антител, которые подвергали дальнейшему скринингу для получения клонов PD-1-112-C2.

SEQ ID NO: 8:	TYMY.
SEQ ID NO: 9:	GINPSNGGTNFNEKFKS.
SEQ ID NO: 10:	RDSNYDGGFDY.
SEQ ID NO: 11:	RASKSVSTSGYSYMH.
SEQ ID NO: 12:	LAYHLES.
SEQ ID NO: 13:	QHSWELPIT.

SEQ ID NO: 14:

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTTYMYWVKQRPQGQGLEWIGGINPSNG  
GTNFNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRDSNYDGGFDYWGQGT  
TLTVSS.

SEQ ID NO: 15:

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHYQQKPGQPPKLLIYLAYH  
LESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHSWELPITFGSGTKLEIKR.

Обращаясь к SEQIDNO: 14 и SEQIDNO: 15: гуманизованные матрицы, которые лучше всего соответствуют их участкам не, являющимися CDR, были выбраны из базы данных Germline. Матрица для тяжелой цепи антитела - IGHV1, а матрица для легкой цепи антитела - IGKV1. В соответствии с принципом повышения структурной стабильности без влияния на структурную стабильность антитела, без влияния на связывание антитела с антигеном, без введения сайтов модификации белка типа гликозилирования и фосфорилирования и без введения таких сайтов, которые легко окисляются или аминируются, гуманизованную последовательность тяжелой цепи составляли в виде VH1-5, а гуманизованную последовательность легкой цепи составляли в виде VL1-3, и, при этом, принимая IGKV7-3\*01 с наибольшей гомологией в качестве другого набора гуманизованных матриц для легкой цепи, была составлена гуманизованная последовательность VL-4. Для получения гуманизованных антител форма образования пары легкой и тяжелой цепей была составлена в виде IGHV1/IGKV2 в качестве общей формы образования пар.

Гены синтезировали в соответствии с аминокислотной последовательностью каждой легкой и тяжелой цепи гуманизованных антител и подвергали расщеплению двумя ферментами: HindIII (NEB) и EcoRI (NEB). Затем фрагменты генов вставляли в экспрессирующий вектор pDNA3.4A (Invitrogen) по сайтам расщепления ферментами HindIII/EcoRI (NEB) с помощью ДНК-лигазы T4 (TAKARA 2011A). Экспрессирующим вектором трансфицировали клетки HEK293 (LifeTechnologies, кат. № 11625019) с помощью реагента для трансфекции полиэтиленimina (PEI) (PolyscienceInc., кат. № 23966) в соотношении 1:2, которые помещали в инкубатор с CO<sub>2</sub> и культивировали в течение 5-7 дней. Экспрессированные антитела выделяли центрифугированием, а затем очищали стандартным методом, получая гуманизованные антитела против PD-1 (с11, с21, с31, с41, с51, с12, с22, с32, с42, с52, с43, с53, с44, с54) по настоящей заявке, причем аминокислотные последовательности 3 клонов гуманизованных антител против PD-1 (с22, с43, с53) представлены в таблице 5.

Таблица 5. Аминокислотные последовательности 3 клонов гуманизованных антител против PD-1 (с22, с43, с53)

Гуманизованное антитело против PD-1	Вариабельная область тяжелой цепи (V <sub>H</sub> )	Вариабельная область легкой цепи (V <sub>L</sub> )
с22	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 6
с43	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 7
с53	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7

SEQ ID NO:3:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPS  
NGGTNFNEKFKSRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRRDSNYDGGFDYWG  
QGTTVTVSS.

SEQ ID NO:4:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYYMYWVRQAPGQGLEWIGGINPSN  
GGTNYAEKFKGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRRDSNYDGGFDYWGQ  
GTTVTVSS.

SEQ ID NO:5:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPS  
NGGTNYAQKFQGRATMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRRDSNYDGGFDYWG  
QGTTVTVSS.

SEQ ID NO:6:

DIQLTQSPSSLSASVGDRATITCRASKSVSTSGYSYMHYQYQKPGKAPKLLIYLAYH  
LESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISVQPEDFATYYCQHSWELPITFGQGKLEIKR.

SEQ ID NO: 7:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSTSGYSYMHYQYQKPGKAPKLLIYLAYH  
LESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSWELPITFGQGKLEIKR.

Пример 10. Характеристика аффинности гуманизованных антител против PD-1

#### 1. Экспериментальный метод

По рекомбинантной технологии получали клеточные линии CHO (клетки яичников китайского хомячка), CHO-hPD1, способные экспрессировать рекомбинантный PD-1 человека на поверхности клеток, и клеточные линии CHO, CHO-супоPD1, способные экспрессировать PD-1 обезьяны на поверхности клеток. Эти две линии клеток будут использоваться при проточной цитометрии (FCM) для определения характеристик связывания гуманизованных моноклональных антител-кандидатов против PD-1 (с22, с43, с53). Конкретный метод заключался в следующем.

Для оценки связывания гуманизованных антител с CHO-hPD1 в 96-луночный планшет вносили по  $2 \times 10^5$  клеток CHO-hPD1, добавляли серийные разведения гуманизованных антител (3-кратные серийные разведения при начальной концентрации 30 мкг/мл) и инкубировали при 4°C в течение 30 минут. Клетки 1 раз промывали буфером (ФСБ, содержащим 3% БСА), а затем добавляли меченное РЕ флуоресцентное вторичное антитело против IgG человека (Fc) Ab (Biolegend), инкубировали при 4°C в течение 30 минут, после чего промывали 1 раз буфером и ресуспендировали в ФСБ. После этого суспензии клеток подвергали анализу методом проточной цитометрии на CytoFlex (проточном цитометре Beckman) и измеряли количество антител, связавшихся с клетками, по средней интенсивности флуоресценции (MFI) окрашивания. Такой же метод применялся для оценки связывания гуманизованных антител с клетками CHO-супо.

## 2. Экспериментальные результаты

Характеристики аффинности гуманизованных антител против PD-1 представлены в таблице 6, и результаты показывают, что гуманизованные антитела против PD-1 по настоящей заявке способны связываться с высокой аффинностью как с клетками CHO-hPD1, так и с клетками CHO-synoPD1.

Таблица 6. Характеристики аффинности гуманизованных антител против PD-1

Порядковый номер	Степень гуманизации	CHO-hPD1	CHO-synoPD1	Активированные МКПК
		FCM, EC <sub>50</sub> , нМ		
c11	96,35%	1,715	0,7967	0,1927
c21	97,40%	1,725	0,9276	0,2235
c31	97,40%	2,450	0,9835	0,2131
c41	97,92%	2,107	0,7721	0,2216
c51	99,22%	1,687	0,8502	0,1886
c12	95,83%	2,119	0,8698	0,1724
c22	96,88%	1,677	0,6299	0,1411
c32	96,88%	2,214	0,6970	0,2761
c42	97,40%	1,441	0,6600	0,2530
c52	98,70%	1,591	0,7943	0,2977
c43	98,18%	1,580	0,8945	0,2815
c53	99,48%	1,710	0,7427	0,2130
c44	96,35%	1,651	0,7091	0,2119
c54	97,66%	2,183	0,8956	0,2402

Пример 11. Связывание гуманизованных антител против PD-1 с активированными МКПК

### 1. Экспериментальный метод

При стимуляции ФГА (Sigma) свежих моноклеарных клеток периферической крови человека (МКПК) лимфоциты активировались и пролиферировали, достигая наибольшего уровня по экспрессии PD1 на третий день, поэтому их можно было использовать для эксперимента по связыванию гуманизованных антител против PD-1 (c22, c43, c53) с PD1, который экспрессируется естественным образом в активированных лимфоцитах. Конкретный метод заключался в следующем.

После получения из свежей периферической крови человека центрифугированием в градиенте среды для разделения лимфатических клеток доводили МКПК до плотности  $1 \times 10^6$  клеток/мл и инокулировали в T75, а затем добавляли ФГА-L (Sigma) в конечной концентрации 1 мкг/мл для стимулирования пролиферации лимфоцитов. После инкубации при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 3 дней клеточную суспензию извлекали и центрифугировали. Супернатант отбрасывали, а осадок ресуспендировали в буфере (ФСБ, содержащий 3% БСА) и вносили в 96-луночный U-образный планшет по  $2 \times 10^5$  на лунку, а затем

добавляли различные серийные разведения гуманизованных антител, инкубировали при 4°C в течение 30 минут и центрифугировали при 300 g в течение 5 минут. Клетки промывали 1 раз буфером, добавляли меченное PE флуоресцентное козье антитело против IgG человека (Biolegend) и инкубировали при 4°C в течение 30 минут. Затем клетки центрифугировали и промывали 1 раз, а затем ресуспендировали в ФСБ и проводили анализ на проточном цитометре CytoFlex для определения количества антител, связавшихся с МКПК.

## 2. Экспериментальные результаты

Результаты по определению способности к связыванию гуманизованных антител против PD-1 с активированными МКПК представлены в таблице 6, причем результаты показывают, что гуманизованные антитела против PD-1 по настоящей заявке способны связываться с активированными лимфоцитами с высокой аффинностью.

По сравнению с мышинным моноклональным антителом PD1-112-C2 против PD-1 (таблица 1) из примеров 2 и 3, гуманизованные антитела против PD-1 (с22, с43, с53) по настоящей заявке обладали сравнимой способностью к связыванию с клетками CHO-hPD1, клетками CHO-супо и активированными МКПК.

### Пример 12. Специфичность связывания гуманизованных антител против PD-1

#### 1. Экспериментальный метод

Проводили связывание гуманизованных антител против PD-1 (с22, с43, с53) по настоящей заявке с четырьмя различными белками-представителями семейства CD28 для проверки специфичности гуманизованных антител против PD-1 при связывании с PD-1. По стандартному методу ELISA на планшете для ELISA иммобилизовали PD-1 (Acro), CD28 (Acro), CTLA-4 (Acro) и ICOS (Acro), соответственно, при концентрации в 1 мкг/мл и добавляли гуманизованное антитело в концентрации 10 мкг/мл. В качестве вторичного антитела использовали конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP) антитело против IgG человека (F). После проявления с помощью ТМБ и остановки реакции проводили считывание значений OD<sub>450</sub> на считывающем устройстве.

#### 2. Экспериментальные результаты

Результаты по специфичности связывания гуманизованных антител против PD-1 представлены в таблице 7, причем эти результаты показывают, что гуманизованные антитела против PD-1 по настоящей заявке способны были специфически связываться с PD-1, но не с другими представителями семейства CD28.

Таблица 7. Результаты по специфичности связывания гуманизованных антител против PD-1

Тестируемое антитело	PD-1-hFc человека	CD28-hFc человека	ICOS-hFc человека	CTLA4-hFc человека
с22	1,3256	0,1799	0,1170	0,2090
с43	1,2296	0,1890	0,1311	0,2549
с53	1,4767	0,1761	0,1327	0,2388

### Пример 13. Определение аффинности гуманизованных антител против PD-1

#### 1. Экспериментальный метод

Определение аффинности на ForteBio (OctetQke). На биосенсор HISIK наносили рекомбинантный белок PD-1-his в концентрации 5 мкг/мл на 120 секунд, а затем заполненный сенсор уравнивали в стандартном буфере (ФСБТ, ФСБ + 0,02% Твин 20) в течение 120 секунд, после чего переносили сенсор в одно разведение

гуманизированного антитела против PD-1 (с22, с43, с53) и оставляли на 180 секунд для измерения скорости ассоциации, а затем переносили в стандартный буфер на 20 минут для измерения скорости диссоциации. Наконец, проводили анализ с использованием кинетической модели, а также проводили обработку данных. В качестве положительного

контроля использовали Opdivo (ABA0333).

## 2. Экспериментальные результаты

Результаты по определению аффинности гуманизированных антител против PD-1 представлены в таблице 8, и они показывают, что все гуманизированные антитела против PD-1 по настоящей заявке способны были связываться с PD-1 с высокой аффинностью.

По сравнению с мышинным моноклональным антителом PD-1-112-C2 против PD-1 (таблица 3) из примера 5, гуманизированные антитела против PD-1 по настоящей заявке обладали сравнимой аффинностью, а по сравнению с положительным контролем Opdivo (таблица 3) аффинность гуманизированных антител против PD-1 по настоящей заявке значительно улучшалась.

Таблица 8. Результаты по определению аффинности гуманизированных антител против PD-1

Тестируемое антитело	$K_{on}$ (1/M·с)	$K_{dis}$ (1/с)	$K_D$ (M)
с22	9,85E+05	<1,0E-07	<1,0E-12
с43	9,84E+05	<1,0E-07	<1,0E-12
с53	9,79E+05	<1,0E-07	<1,0E-12

## Пример 14. Блокирование связывания лиганда PD-L1/PD-L2 с CHO-hPD1

гуманизированными антителами против PD-1

### 1. Экспериментальный метод

На проточном цитометре анализировали способность гуманизированных антител против PD-1 блокировать связывание лигандов с трансфицированными клетками CHO, способными стабильно экспрессировать PD-1 на своей поверхности. Белки лигандов, используемые в эксперименте, представляли собой слитые белки рекомбинантного внеклеточного сегмента PD-L1/PD-L2, соединенные с Fc-сегментом IgG1 мыши: PD-L1-mFc и PD-L2-mFc. Белками лигандов в эксперименте служили два рекомбинантных слитых белка: PD-L1-mFc и PD-L2-mFc, которые образовались при соединении внеклеточных сегментов PD-L1/PD-L2 с Fc-сегментом IgG1 мыши.

Клетки CHO-PD1 ресуспендировали в буфере (ФСБ, содержащем 3% БСА) и доводили до плотности  $2 \times 10^6$  клеток/мл. Суспензию клеток вносили в 96-луночный U-образный планшет по 100 мкл на лунку и центрифугировали при 300 g в течение 5 минут, а затем отбрасывали супернатант. В лунки, содержащие клетки, добавляли PD-L1-mFc/PD-L2-mFc в концентрации 0,2 мкг/мл, инкубировали при 4°C в течение 30 минут, а затем добавляли серийные разведения гуманизированных антител против PD-1 (с22, с43, с53) и инкубировали при 4°C в течение 30 минут.

Клетки центрифугировали при 300 g в течение 5 минут, промывали 1 раз буфером, добавляли меченное PE флуоресцентное козье антитело против IgG мыши (Biolegend) и инкубировали при 4°C в течение 30 минут. Клетки центрифугировали и промывали 1 раз, а затем ресуспендировали в ФСБ и проводили анализ на проточном цитометре CytoFlex для определения количества белка лиганда, связавшегося с клетками, и расчета значения  $IC_{50}$  антитела к PD-1 при блокировании связывания.

### 2. Экспериментальные результаты

Результаты по определению аффинности гуманизованных антител против PD-1 представлены в таблице 9, и эти результаты показывают, что все гуманизованные антитела против PD-1 по настоящей заявке способны были эффективно блокировать связывание PD-L1/PD-L2 с клетками CHO-PD1.

Таблица 9. Результаты по определению аффинности гуманизованных антител против PD-1

Тестируемое антитело	FCM, IC <sub>50</sub> , нМ	
	Блокирование связывания CHO-hPD1 с PD-L1	Блокирование связывания CHO-hPD1 с PD-L2
c22	3,100	6,876
c43	3,143	7,951
c53	3,024	7,049

Пример 15. Влияние гуманизованных антител против PD-1 на смешанную лимфоцитарную реакцию

#### 1. Экспериментальный метод

При смешанной лимфоцитарной реакции (MLR) в присутствии или в отсутствие гуманизованных антител против PD-1 может проявляться пролиферация Т-клеток и уровень цитокинов, секретируемых Т-клетками, характерный для ситуации, когда блокируется передача сигналов PD1. Конкретный метод заключался в следующем.

Из свежих МКПК выделяли моноциты CD14<sup>+</sup> с помощью микрошариков с CD14 человека (Miltenyi), индуцировали их в присутствии ГМ-КСФ/ИЛ-4 в течение 6 дней, затем добавляли TNF- $\alpha$  и индуцировали созревание клеток ДК через 3 дня. В день эксперимента очищали Т-клетки из МКПК с помощью набора для обогащения Т-клеток человека EasySep<sup>TM</sup> (StemCell). Смешивали по  $1 \times 10^5$  Т-клеток с  $1 \times 10^4$  клеток ДК на лунку и проводили культивирование, а к смешанным клеткам добавляли различные серийные разведения гуманизованных антител против PD-1 (c22, c43, c53). Кроме того, ставили одну лунку с антителом для контроля на изотип и контрольную лунку без антител. Через 3 дня из смешанной культуры отбирали супернатанты и определяли ИЛ-2, а еще через 2 дня культивирования отбирали супернатанты и определяли ИНФ- $\gamma$ .

#### 2. Экспериментальные результаты

Результаты по влиянию гуманизованных антител против PD-1 на смешанную лимфоцитарную реакцию представлены в таблице 10. Эти результаты показывают, что в эксперименте по MLR гуманизованные антитела против PD-1 по настоящей заявке способны блокировать связывание PD1 с лигандом и ингибировать сигнальный путь PD1, тем самым усиливая пролиферацию Т-клеток и стимулируя секрецию цитокинов ИЛ-2 и ИНФ- $\gamma$  Т-клетками.

Таблица 10. Влияние гуманизованных антител против PD-1 на смешанную лимфоцитарную реакцию

Тестируемое антитело	EC <sub>50</sub> для IL2	EC <sub>50</sub> для IFN $\gamma$
	нМ	нМ
c22	13,34	0,7274
c43	2,792	2,735
c53	1,881	6,649

Пример 16. Оценка противоопухолевого действия гуманизованного антитела против PD-1 *in vivo* на раковых клетках толстой кишки мыши

#### 1. Экспериментальный метод

Цель эксперимента: определить противоопухолевое действие гуманизованного антитела против PD-1 (c53) *in vivo* против раковых клеток толстой кишки мышей (клеток MC38), в группе контроля на изотип (Isotype) и в группе положительного контроля (Sintilimab) одновременно.

Экспериментальные материалы: 6-8-недельные самки мышей с внедренным геном hPD1 Knock-in (на фоне C57BL/6, источник: Beijing Vitalstar Biotechnology Co., Ltd.); клетки MC38 (National Infrastructure of Cell Line Resources); БСА (Gibco, 10091-148), 0,25% трипсин-ЭДТА (Gibco, 25200056), ДМСО (Sigma, D2650), фосфатно-солевой буфер Дюльбекко (Hyclone, SH30028.02), пенициллин-стрептомицин (Gibco, 15140122), среда DMEM с высоким содержанием глюкозы (Gibco, 11965084), фетальная телячья сыворотка (Gibco) и глутамин (Gibco).

Приборы и оборудование: электронные весы (Shanghai Sunny Hengping Scientific Instrument Co., Ltd., JA12002), штангенциркуль (Shanghai Menet Industrial Co., Ltd., MNT-150T), микроскоп (Chongqing Optec Instrument Co., Ltd., BDS200), медицинская центрифуга (Hunan Xiangyi Laboratory Instrument Development Co., Ltd., L530R), водяная баня с постоянной температурой и цифровым дисплеем (Precision Machinery Co., Ltd., HH-S), инкубатор с углекислым газом (Panasonic Healthcare Co., Ltd., Япония, MCO-18AC), двойной сверхчистый рабочий стол вертикального типа (Wuxi Yichun Purification Equipment Co., Ltd., SW-CJ-VS2).

#### Экспериментальные операции

Культивирование клеток: клетки MC38 культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки, 1% глутамина и 1% пенициллина-стрептомицина (1:1).

Инокуляция: собирали клетки MC38 в логарифмической фазе роста и довели до концентрации  $3 \times 10^6$  клеток/мл. Отбирали 40 самок мышей hPD1 и инокулировали им подкожно клетки MC38 в объеме 0,1 мл на мышь, т.е.  $3 \times 10^5$  клеток на мышь.

Введение: день инокуляции регистрировали как день 0 (D0). На 7-й день мышей случайным образом разбивали на 3 группы в зависимости от объема опухолей, по 8 мышей в каждой группе, и начинали введение (вводимая доза, способ и частота введения клеток модели опухоли MC38 представлены в таблице 11).

Таблица 11

Группа	Время и способ введения	Вводимый объем	Количество животных в группе
Изотип (5 мг/кг)	D7, D10, D13, D16 внутрибрюшинно (в/б)	0,2 мл на 10 г массы тела	8
c53 (5 мг/кг)			
Синтилимаб (5 мг/кг)			

Регистрация данных: измерение и запись объема опухолей начинали в D7, а затем два раза в неделю штангенциркулем измеряли длину и ширину опухолей. Объем опухолей рассчитывали по формуле:  $(1/2) \times \text{длина} \times (\text{ширина})^2$ . Когда мыши достигали конечной точки эксперимента (объем опухолей превышал 2000 мм<sup>3</sup>, достигая конечной точки с точки зрения гуманности), мышей забивали путем смещения шейных позвонков и регистрировали кривую выживаемости.

## 2. Экспериментальные результаты

Результаты по влиянию гуманизованного антитела против PD-1 на объем опухолей представлены в таблице 12 и на фиг. 4. Видно, что по сравнению с группой изотипа гуманизованное антитело против PD-1 (c53) оказывало значительный ингибирующий эффект на рост опухолей на модели опухолей MC38 (TGI = 104,44%, у 7 мышей было полное устранение опухолей), что сравнимо с противоопухолевым эффектом в группе синтилимаба (TGI = 105,81%, 7 мышей были полностью свободны от опухолей).

Результаты по влиянию гуманизованного антитела против PD-1 на выживаемость мышей представлены на фиг. 5. Видно, что по сравнению с группой изотипа гуманизованное антитело против PD-1 (c53) явно повышало выживаемость мышей.

Таблица 12. Влияние гуманизованного антитела против PD-1 на объем опухолей (мм<sup>3</sup>)

День после введения	Изотип (5 мг/кг)	c53 (5мг/кг)	Синтилимаб (5 мг/кг)
7	67,54	64,80	66,28
10	103,33	106,47	136,76
13	149,58	41,79	41,96
17	256,60	15,31	12,02
21	437,02	10,52	6,80
25	728,07	14,17	5,40
28	1078,98	19,88	7,49
31	1011,44	28,18	18,07
34	2356,39	46,12	26,61

Приведенные выше результаты показывают, что гуманизованное антитело против PD-1 (c53), представленное в настоящей заявке, способно значительно ингибировать рост клеток MC38, эффективно повышать выживаемость мышей и оказывать значительный лечебный эффект при лечении рака толстой кишки у мышей.

Вышеприведенные воплощения являются предпочтительными воплощениями настоящей заявки. Однако реализация настоящей заявки не ограничивается приведенными выше воплощениями. Любые другие изменения, модификации, замены, комбинации и упрощения, произведенные без отхода от духовной сущности и принципа настоящей заявки, должны быть эквивалентным способом замены, и все они включены в заявленный объем настоящей заявки.

## SEQUENCE LISTING

<110> Guangdong Fapon Biopharma Inc.  
 <120> ANTI-PD-1 HUMANIZED ANTIBODY OR ANTIGEN-BINDING FRAGMENT THEREOF  
 AND APPLICATION THEREOF  
 <130> PN214664FPSW  
 <150> CN202110654827.4  
 <151> 2021-06-11  
 <160> 15  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Forward primer  
 <400> 1  
 ccgcaagctt gccgccacca tg 22  
 <210> 2  
 <211> 53  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Reverse primer  
 <400> 2  
 ccggaattct cattaatggt gatggtgatg atgctggaac tggccggcag gtc 53  
 <210> 3  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> c22 VH  
 <400> 3  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

RU 2 829 508 C2

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Thr Arg Arg Asp Ser Asn Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110  
5 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120  
<210> 4  
<211> 120  
<212> PRT  
10 <213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> c43 VH  
<400> 4  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
15 1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr  
20 20 25 30  
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
20 Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Glu Lys Phe  
50 55 60  
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
25 85 90 95  
Thr Arg Arg Asp Ser Asn Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110  
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120  
30 <210> 5  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
35 <223> c53 VH  
<400> 5  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr  
40 20 25 30  
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45  
Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60  
45 Gln Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

RU 2 829 508 C2

	Thr	Arg	Arg	Asp	Ser	Asn	Tyr	Asp	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
				100					105					110		
	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
				115				120								
5	<210>	6														
	<211>	112														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial Sequence														
	<220>															
10	<223>	c22 VL														
	<400>	6														
	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5					10					15	
	Asp	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Thr	Ser
15			20						25					30		
	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro
			35					40					45			
	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Tyr	His	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
		50					55					60				
20	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
	65					70					75					80
	Ser	Val	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Trp
					85					90					95	
	Glu	Leu	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg
25				100					105						110	
	<210>	7														
	<211>	112														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial Sequence														
	<220>															
30	<223>	c43/c53 VL														
	<400>	7														
	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5					10					15	
35	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Thr	Ser
			20						25					30		
	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro
			35					40					45			
	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Tyr	His	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
40		50					55					60				
	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
	65					70					75					80
	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Trp
					85					90					95	
45	Glu	Leu	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg
				100					105						110	
	<210>	8														
	<211>	5														

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> HCDR1  
 5 <400> 8  
 Thr Tyr Tyr Met Tyr  
 1 5  
 <210> 9  
 <211> 17  
 10 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> HCDR2  
 <400> 9  
 15 Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Ser  
 <210> 10  
 <211> 11  
 20 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> HCDR3  
 <400> 10  
 25 Arg Asp Ser Asn Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr  
 1 5 10  
 <210> 11  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> LCDR1  
 <400> 11  
 Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His  
 35 1 5 10 15  
 <210> 12  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 40 <220>  
 <223> LCDR2  
 <400> 12  
 Leu Ala Tyr His Leu Glu Ser  
 1 5  
 45 <210> 13  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

```

<220>
<223> LCDR3
<400> 13
Gln His Ser Trp Glu Leu Pro Ile Thr
5 1 5
<210> 14
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
10 <220>
<223> Heavy chain variable region
<400> 14
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
15 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30
Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
20 Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
25 Thr Arg Arg Asp Ser Asn Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 15
30 <211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Light chain variable region
35 <400> 15
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30
40 Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Tyr His Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
45 65 70 75 80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
85 90 95
Glu Leu Pro Ile Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

```

## (57) Формула изобретения

1. Гуманизированное антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, включающие область CDR легкой цепи и область CDR тяжелой цепи, причем область CDR тяжелой цепи состоит из HCDR1, HCDR2 и HCDR3, а область CDR легкой цепи состоит из LCDR1, LCDR2 и LCDR3, аминокислотные последовательности HCDR1 и HCDR3 представлены последовательно в SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 10, а аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представлены последовательно в SEQ ID NO: 11-13, при этом аминокислотная последовательность

вариабельной области тяжелой цепи антитела представлена в любой из SEQ ID NO: 3-5.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, при этом аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела представлена в любой из SEQ ID NO: 6-7.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, при этом аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 3, а аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 6, или

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 4, а аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 7, или

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 5, а аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела представлена в SEQ ID NO: 7.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, при этом антитело содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, причем константная область тяжелой цепи представляет собой любой один или несколько из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE или IgM; а константная область легкой цепи представляет собой  $\kappa$ - или  $\lambda$ -цепь.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, при этом антитело представляет собой химерное антитело, а антигенсвязывающий фрагмент представляет собой любой один или несколько из F(ab')<sub>2</sub>, Fab, scFv, Fv и однодоменного антитела.

6. Нуклеиновая кислота, кодирующая гуманизированное антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5.

7. Нуклеиновая кислота по п. 6, которая включает: первую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и/или вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

8. Вектор, несущий нуклеиновую кислоту по п. 6 или 7, где вектор является экспрессирующим вектором.

9. Клетка, экспрессирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-5, где указанная клетка включает нуклеиновую кислоту по п. 6 или 7 или вектор по п. 8.

10. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, опосредованного PD-1, включающая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, нуклеиновую кислоту по п. 6 или 7, вектор по п. 8 или клетку по

п. 9 и фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель.

11. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-5, нуклеиновой кислоты по п. 6 или 7, вектора по п. 8, клетки по п. 9 или фармацевтической композиции по п. 10 при получении лекарственного средства для  
5 лечения заболевания или состояния, опосредованного PD-1.

12. Способ лечения заболевания или состояния, опосредованного PD-1, включающий:  
введение эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента  
по любому из пп. 1-5, нуклеиновой кислоты по п. 6 или 7, вектора по п. 8, клетки по п.  
9 или фармацевтической композиции по п. 10.

10

15

20

25

30

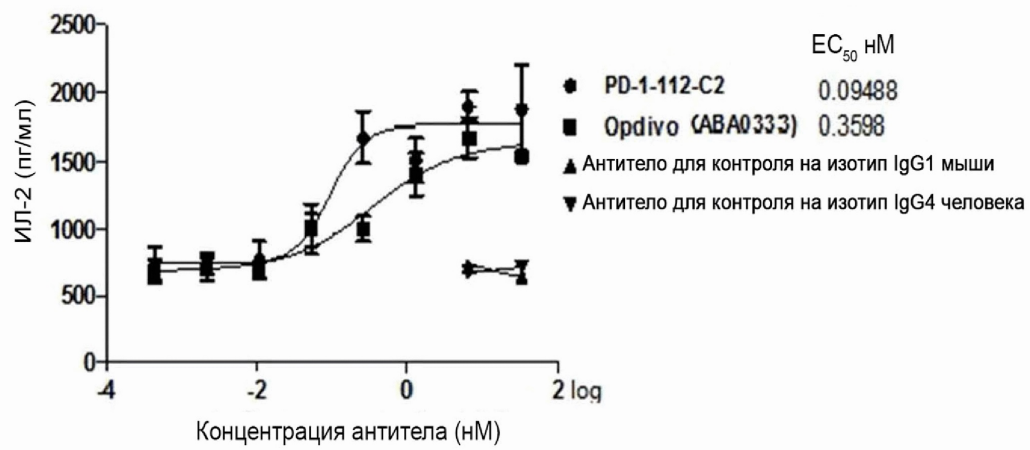
35

40

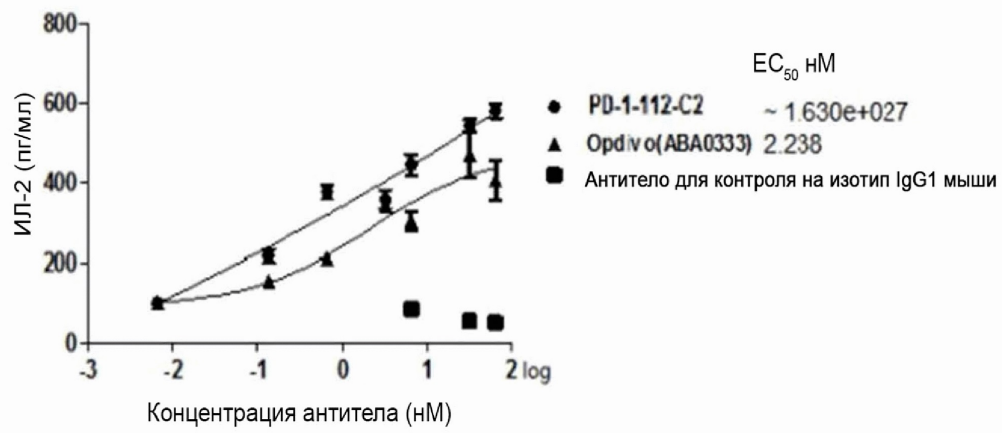
45

1

1/3



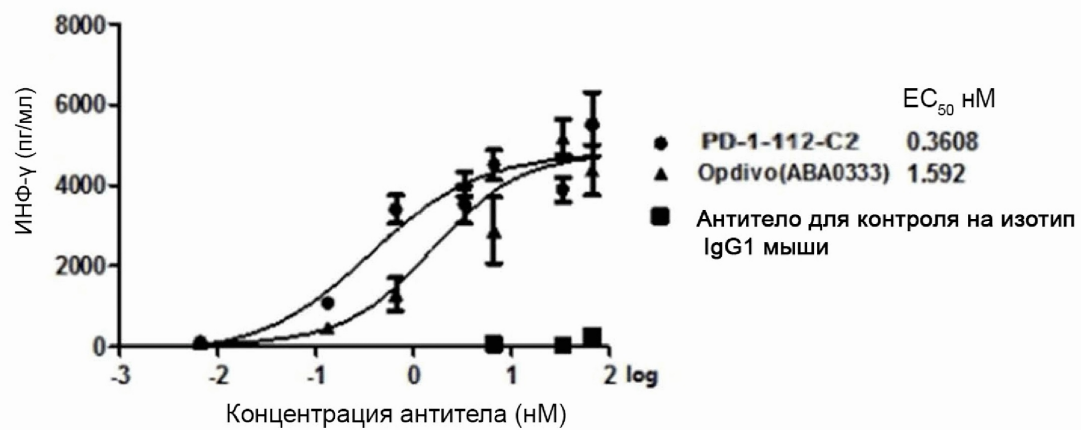
Фиг. 1



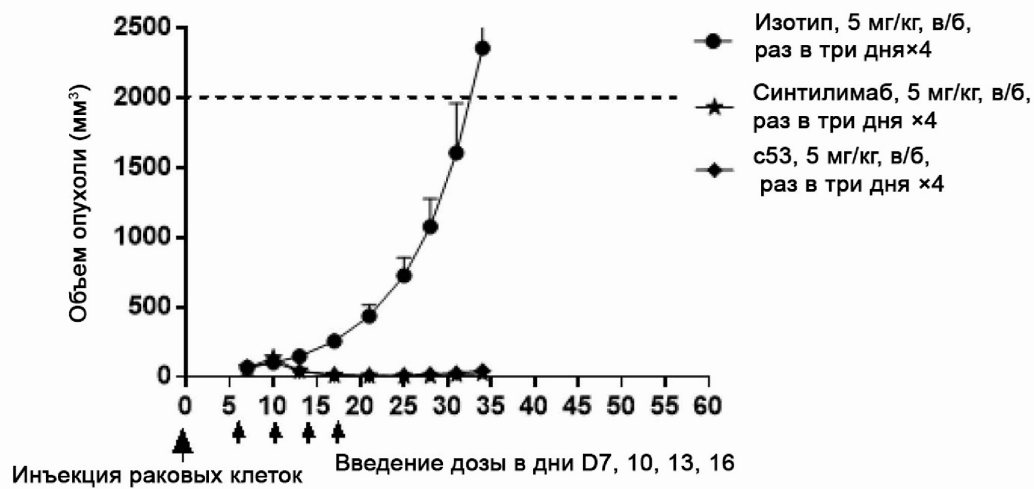
Фиг. 2

2

2/3

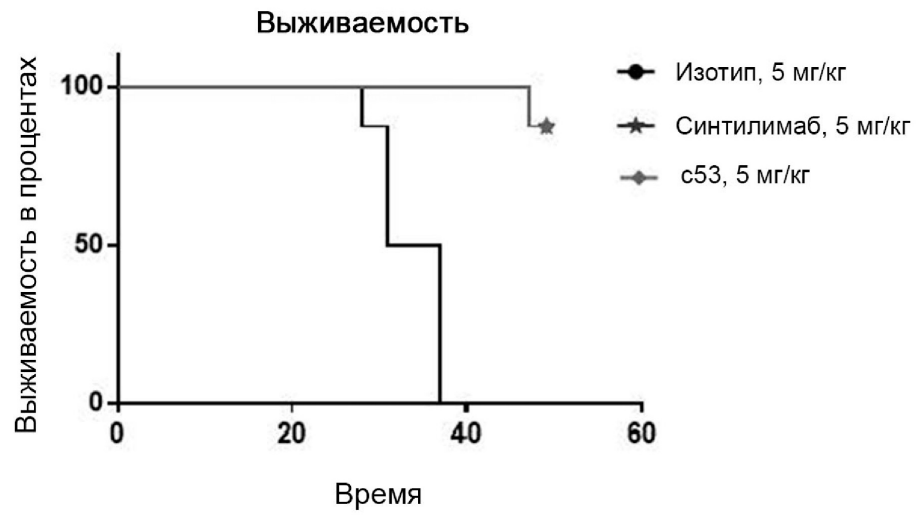


Фиг. 3



Фиг. 4

3/3



Фиг. 5