УКРАЇНА

(19) UA (11) 124631 (13) C2

(51) МПК (2021.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО "УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2019 03714**
(22) Дата подання заявки: **14.09.2017**
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **21.10.2021**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **62/394,314**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **14.09.2016**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**
(41) Публікація відомостей про заявку: **27.05.2019, Бюл.№ 10**
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **20.10.2021, Бюл.№ 42**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору PCT: **PCT/US2017/051531, 14.09.2017**

(72) Винахідник(и):
Афар Деніел Е. Х. (US),
Хардінг Фіона А. (US),
Самайоа Хосуе (US)

(73) Володілець (володільці):
ЕББВІ БАЙОТЕРАПЬЮТІКС ІНК.,
1500 Seaport Boulevard, Redwood City, California 94063, United States of America (US)

(74) Представник:
Бреус Наталія Володимирівна, реєстр. №167

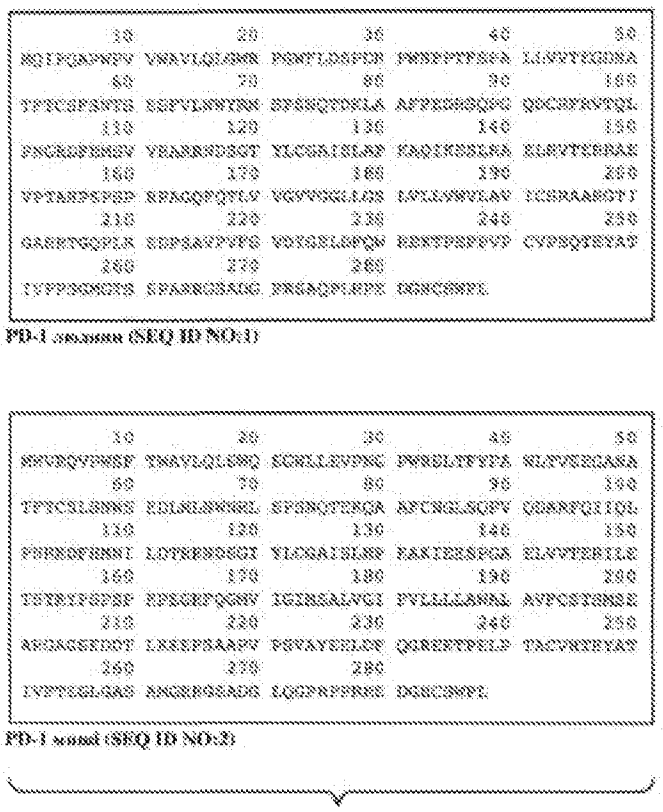
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2016106159 A1, 30.06.2016
EP 3026062 A1, 01.06.2016

(54) АНТИТІЛО ДО PD-1

(57) Реферат:

Винахід стосується антитіла до PD-1. Також винахід стосується фармацевтичної композиції, нуклеїнової кислоти, вектора, еукаріотичної клітини-хазяїна, способу одержання антитіла до PD-1, способу активації імунної системи, способу лікування раку.

UA 124631 C2



Фіг. 1A

Дана заявка заявляє пріоритет згідно з § 119(e) розділу 35 Зводу федеральних законів США на підставі попередньої заявки на патент США № 62/394314, поданої 14 вересня 2016 року, вміст якої включений у даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

2. ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

Дана заявка містить перелік послідовностей, який був наданий в електронному вигляді у форматі ASCII і цим включений за допомогою посилання у всій повноті. Вказана ASCII- копія, створена 10 серпня 2017 року, називається 381493-327WO_SL.txt і має розмір 33195 байтів.

3. ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Дана заявка стосується, окрім всього іншого, нових антитіл до PD-1, композицій, що містять дані нові антитіла, нуклеїнових кислот, що кодують дані антитіла, а також способів їх одержання та застосування.

4. РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Види терапії раку передбачають широкий діапазон терапевтичних підходів, включаючи хірургічне втручання, опромінення та хіміотерапію. Незважаючи на те, що різні підходи забезпечують широкий вибір методів для лікування раку, доступних практикуючому лікарю, наявні терапевтичні засоби характеризуються цілою низкою недоліків, таких як відсутність вибірковості під час націлювання на ракові клітини, а не на нормальні здорові клітини, а також розвиток стійкості раку до лікування.

Нещодавно розроблені підходи, основані на терапевтичних засобах, що здійснюють цілеспрямований вплив, які переважно порушують клітинні процеси в ракових клітинах, а не в нормальних клітинах, привели до схем хіміотерапії з меншою кількістю побічних ефектів порівняно з видами терапії, що здійснюють нецілеспрямований вплив, такими як променева терапія.

Імунотерапія раку перетворилася на перспективний терапевтичний підхід, що доповнює існуючі стандарти лікування. Див., наприклад, Miller, et al. Cancer Cell, 27, 439-449 (2015). Такі імунотерапевтичні підходи включають розробку антитіл, застосовуваних для модулювання знищення ракових клітин імунною системою.

Наприклад, взаємодія PD-1, рецептора клітинної поверхні I типу, з будь-яким з двох своїх лігандів, PD-L1 або PD-L2, веде до домінуючого негативного сигналу для контрольних точок, який обмежує подальшу активацію клітин, що запускається антигенним рецептором. Ліганди для PD-1 на різному рівні експресуються на різних тканинах і типах клітин, включаючи антигенпрезентувальні клітини імунної системи, та їхня експресія підвищена на багатьох типах пухлинних клітин. Підвищення експресії PD-L1 у межах пухлинного мікрооточення являє собою вірогідний механізм того, як пухлини руйнують захисні протипухлинні імунні відповіді хазяїна. Антитіла, націлені на PD-1, які блокують взаємодію рецептора з будь-яким з його лігандів, ведуть до інгібування передачі негативного сигналу. Було продемонстровано, що in vitro інгібування опосередкованого PD-1 сигналу для контрольних точок веде до тривалої антиген-специфічної активації Т-клітин. Було показано, що in vivo блокування PD-1 посилює протипухлинні імунні відповіді як на мишачих моделях сингенної пухлини, так і в клінічних дослідженнях на людях.

Протипухлинні імунні відповіді у пацієнтів із солідними пухлинами були посилені за рахунок лікування, спрямованого проти PD-1. Існують два схвалених та зареєстрованих на ринку антагоністичних моноклональних антитіла до PD-1: ніволумаб (OPDIVO®) та пембролізумаб (KEYTRUDA®), які були схвалені у США та Європейському Союзі для лікування таких захворювань, як неоперабельна або метастатична меланома та метастатичний недрібноклітинний рак легені. Лікування пацієнтів за допомогою даних засобів спричиняло протипухлинні відповіді, які вимірювали як збільшення виживаності без прогресування та/або загальної виживаності.

Остання невдача OPDIVO® у сповільненні прогресування задавненого раку легені у групи пацієнтів, які раніше не отримували лікування, у клінічному дослідженні, в якому порівнювали OPDIVO® з традиційною хіміотерапією, підкреслює необхідність у альтернативних підходах і додаткових засобах лікування раку, що доповнюють існуючі терапевтичні стандарти лікування.

5. КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

У даному винаході представлені антитіла до PD-1 та їхні зв'язувальні фрагменти, які специфічно зв'язуються з PD-1. Амінокислотні послідовності ілюстративних CDR, а також амінокислотні послідовності ділянок V_H та V_L важкого та легкого ланцюгів ілюстративних антитіл до PD-1 наведені в докладному описі нижче. Антитіла, представлені у даному документі, запобігають взаємодії рецептора PD-1 з будь-яким з його лігандів (PD-L1, SEQ ID NO:3; PD-L2, SEQ ID NO:4), що спричиняє інгібування передачі негативного сигналу й активації адаптивної імунної відповіді.

Антитіла до PD-1 можуть містити модифікації та/або мутації, які змінюють властивості антитіл, як, наприклад, збільшують період на півжиття, збільшують або зменшують ADCC тощо, як відомо з рівня техніки.

У даному документі також представлені нуклеїнові кислоти, що містять нуклеотидні послідовності, які кодують антитіла до PD-1 за даним винаходом, а також вектори, що містять нуклеїнові кислоти. Крім того, у даному документі представлені прокаріотичні та еукаріотичні клітини-хазяїни, трансформовані за допомогою вектора, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує розкрите антитіло до PD-1, а також еукаріотичні клітини-хазяїни (наприклад, клітини, одержані від ссавців), сконструйовані для експресії нуклеотидних послідовностей. Також представлені та додатково обговорюються у докладному описі нижче способи одержання антитіл шляхом культивування клітин-хазяїнів і виділяння антитіл.

В іншому аспекті даного винаходу представлені композиції, що містять антитіла до PD-1, описані в даному документі. Композиції зазвичай містять одне або декілька антитіл до PD-1, описуваних у даному документі, та/або їхні солі та один або декілька наповнювачів, носіїв або розріджувачів.

У даному винаході представлені способи лікування суб'єктів, таких як суб'єкти-люди, з діагностованою солідною пухлиною або злоякісним захворюванням крові за допомогою антитіла до PD-1. Спосіб зазвичай передбачає введення суб'єкту певної кількості антитіла до PD-1, описаного в даному документі, ефективної для забезпечення терапевтичного ефекту. У суб'єкта може бути діагностоване будь-що з цілої низки солідних пухлин або злоякісних захворювань крові, які можуть бути діагностованими вперше, рецидивними або рецидивними та рефрактерними. Антитіло до PD-1 зазвичай вводять у вигляді внутрішньовенної інфузії два рази на тиждень, один раз на тиждень, один раз на два тижні, один раз на три тижні, один раз на чотири тижні, один раз на п'ять тижнів, один раз на шість тижнів, один раз на сім тижнів або один раз на вісім тижнів.

Антитіла до PD-1 можна вводити у вигляді окремих терапевтичних засобів (монотерапія), або додатково до інших терапевтичних засобів, які зазвичай, але не обов'язково, застосовують для лікування солідної пухлини або злоякісного захворювання крові, або разом з ними. Терапевтичні засоби, як правило, будуть застосовуватися в дозі, за допомогою шляху введення та за частоти введення, які схвалені для них, але їх також можна застосовувати і в нижчих дозах.

Антитіла до PD-1 можна вводити різними шляхами або способами введення, що включають без обмеження внутрішньовенну інфузію та/або ін'єкцію, внутрішньо пухлинну ін'єкцію та підшкірну ін'єкцію. Кількість, яку вводять, буде залежати від шляху введення, схем дозування, типу раку, що підлягає лікуванню, стадії раку, що підлягає лікуванню, та інших параметрів, таких як вік і маса пацієнта, як добре відомо з рівня техніки. Конкретні ілюстративні схеми дозування, які, як очікується, забезпечують терапевтичний ефект, наведені в докладному описі.

6. КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

На Фіг. 1A-1B показані амінокислотні послідовності PD-1 людини (SEQ ID NO:1), PD-1 миші (SEQ ID NO:2), PD-L1 людини (SEQ ID NO:3) та PD-L2 людини (SEQ ID NO:4). На Фіг. 1A зображені послідовності PD-1 людини та миші; на Фіг. 1B зображені послідовності PD-L1 та PD-L2 людини.

На Фіг. 2 представлені амінокислотні послідовності ділянок V_H та V_L в ілюстративних антитілах до PD-1 за даним винаходом.

На Фіг. 3A-3C показані ефекти окиснювальних умов та умов зі змінною температурою на ілюстративне гуманізоване антитіло Hu12A11.2b1 та його варіанти з точковими мутаціями в залишку 99 згідно з Kabat у CDR-H3. На Фіг. 3A зображено зв'язування Hu12A11.2b1, що зберігалося за -80, 5, 25 або 40 °C протягом 30 днів або зазнало впливу окиснювальних умов (1 % пероксид водню, "1 % HP"; або 1 % трет-бутилгідропероксид, "1 % TBHP"), з PD-1 на клітинах Jurkat; на Фіг. 3B зображено зв'язування антитіл до PD-1, Hu12A11.2b1, Hu12A11.2b2, Hu12A11.2b3 та Hu12A11.2b4; на Фіг. 3C зображено зв'язування Hu12A11.2b4 з PD-1 на клітинах Jurkat після інкубації за -80, 5, 25 або 40 °C протягом 30 днів.

На Фіг. 4A-4B показана біологічна активність ніволумабу та Hu12A11.2b4 в аналізах відповіді змішаних лімфоцитів (MLR) та відповіді на стимуляцію антигеном правцевого анатоксину. На Фіг. 4A показано збільшення рівнів IL-2 або інтерферону-гамма (IFN-γ) в культурах змішаних лейкоцитів після обробки 10 мкг/мл ніволумабу, Hu12A11.2b4 або ізотипічного контролю. На Фіг. 4B показана відповідь у вигляді збільшення рівня IFN-γ залежна від дози ніволумабу, Hu12A11.2b4 або ізотипічного контролю, в аналізі відповіді на правцевий анатоксин.

7. ДОКЛАДНИЙ ОПИС

Даний винахід стосується антитіл та фрагментів, які специфічно зв'язують PD-1, композицій, що містять дані антитіла, полінуклеотидів, що кодують антитіла до PD-1, клітин-хазяїнів, здатних виробляти дані антитіла, способів та композицій, застосовних для одержання даних антитіл та зв'язувальних фрагментів, та різних способів застосування вищезгаданого.

Як буде зрозуміло фахівцям у даній галузі, антитіла є "модульними" за своєю природою. У всьому даному розкритті будуть описані різні конкретні варіанти здійснення різних "модулів", що складають антитіла. Як конкретні не обмежувальні приклади описані різні конкретні варіанти здійснення CDR V_H, ланцюгів V_H, CDR V_L та ланцюгів V_L. Передбачено, що всі конкретні варіанти здійснення можуть бути об'єднані один з одним, як якби кожна конкретна комбінація була явно описана окремо.

7.1. Скорочення

Описувані у даному документі антитіла, зв'язувальні фрагменти та полінуклеотиди у багатьох варіантах здійснення описані за допомогою їхніх відповідних поліпептидних або полінуклеотидних послідовностей. Якщо не вказано інше, поліпептидні послідовності наведені в орієнтації N→C; полінуклеотидні послідовності - в орієнтації 5'→3'. Для поліпептидних послідовностей можна застосовувати традиційні три - або однобуквені скорочення амінокислот, що кодуються генетичним кодом, які вказані в таблиці 1 нижче.

Таблиця 1

Скорочення кодованих амінокислот

Амінокислота	Трибуквене скорочення	Однобуквене скорочення
Аланін	Ala	A
Аргінін	Arg	R
Аспарагін	Asn	N
Аспарагінова кислота	Asp	D
Цистеїн	Cys	C
Глутамінова кислота	Glu	E
Глутамін	Gln	Q
Гліцин	Gly	G
Гістидин	His	H
Ізолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лізин	Lys	K
Метіонін	Met	M
Фенілаланін	Phe	F
Пролін	Pro	P
Серин	Ser	S
Треонін	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Тирозин	Tyr	Y
Валін	Val	V

Певні послідовності визначаються структурними формулами, що вказують на амінокислотні залишки, що належать до певних класів (наприклад, аліфатичні, гідрофобні тощо). Різні класи, до яких належать амінокислоти, які кодуються генетичним кодом, використовувані в даному документі, указані в таблиці 2 нижче. Деякі амінокислоти можуть належати до більш ніж одного класу. Цистеїн, який містить сульфгідрильну групу, та пролін, який є конформаційно обмеженим, не належать до жодного з класів.

Таблиця 2

Класи кодованих амінокислот

Клас	Амінокислоти
Аліфатичні	A, I, L, V
Ароматичні	F, Y, W
Неполярні	M, A, I, L, V
Полярні	N, Q, S, T
Основні	H, K, R
Кислі	D, E
Малі	A, G

Скорочення, що використовуються для різних ілюстративних антитіл, розкритих у даному документі, наведені в таблиці 3 нижче.

Таблиця 3

Скорочення антитіл

Клон/Назва	Скорочення	Послідовність V_H (Фіг. 2)	Послідовність V_L (Фіг. 2)
Мишаче 12A11	Mu12A11	V_H Mu12A11 SEQ ID NO:31	V_L Mu12A11 SEQ ID NO:41
Гуманізоване 12A11.1b	Hu12A11.1b	V_H Hu12A11.1b SEQ ID NO:32	V_L Hu12A11.1a SEQ ID NO:42
Гуманізоване 12A11.2b з CDR миші	Hu12A11.2b1	V_H Hu12A11.2b SEQ ID NO:33	V_L Hu12A11.1a SEQ ID NO:42
Гуманізоване 12A11.2 з M99I у CDR-H3	Hu12A11.2b2	M99I-варіант V_H Hu12A 11.2b SEQ ID NO:34	V_L Hu12A11.1a SEQ ID NO:42
Гуманізоване 12A11.2b з M99V у CDR-H3	Hu12A11.2b3	M99V-варіант V_H Hu12A11.2b SEQ ID NO:35	V_L Hu12A11.1a SEQ ID NO:42
Гуманізоване 12A11.2b з M99L у CDR-H3	Hu12A11.2b4	M99L-варіант V_H Hu12A11.2b SEQ ID NO:36	V_L Hu12A11.1a SEQ ID NO:42

7.2. Визначення

Якщо в даному документі не вказано інше, наукові та технічні терміни, що використовуються у зв'язку з даним винаходом, повинні мати значення, які зазвичай зрозумілі фахівцям у даній галузі.

7.3. Антитіла до PD-1 та зв'язувальні фрагменти

В одному аспекті даний винахід стосується антитіл та/або їхніх зв'язувальних фрагментів, що специфічно зв'язують рецептор білка 1 запрограмованої клітинної смерті (PD-1) (також відомий як PDCD1, CD279, PD1, SLEB2 або SLE1).

Використовуваний у даному документі термін "антитіло" (Ab) стосується молекули імуноглобуліну, яка специфічно зв'язує конкретний антиген, у даному випадку PD-1. У деяких варіантах здійснення антитіла до PD-1 за даним винаходом зв'язуються з PD-1 людини та здійснюють таким чином модулювальний вплив на імунну систему. Зумовлена цим відповідь імунної системі є цитотоксичною для пухлинних клітин. Антитіла до PD-1 за даним винаходом містять ділянки, що визначають комплементарність (CDR), також відомі як гіперваріабельні ділянки, у варіабельних доменах як легкого ланцюга, так і важкого ланцюга. Частини варіабельних доменів, що характеризуються вищою консервативністю, називаються каркасними ділянками (FR). Як відомо з рівня техніки, амінокислотне положення/межа, що визначають гіперваріабельну ділянку антитіла, можуть варіювати залежно від контексту, та з рівня техніки відомі різні визначення. Деякі положення в межах варіабельного домену можуть розглядати як гібридні гіперваріабельні положення в тому сенсі, що ці положення можна вважати такими, що знаходяться в межах гіперваріабельної ділянки за одним набором критеріїв, та водночас їх можна вважати такими, що знаходяться за межами гіперваріабельної ділянки за іншим набором

критеріїв. Одне або декілька з цих положень також можуть знаходитися в розширених гіперваріабельних ділянках. У даному винаході представлені антитіла, що містять модифікації в таких гібридних гіперваріабельних положеннях. Кожний із варіабельних доменів нативних важкого та легкого ланцюгів містить чотири ділянки FR, які переважно набувають конфігурації β-складчастої структури, з'єднаних трьома CDR, які утворюють петлі, що з'єднують β- складчасті структури та в деяких випадках утворюють їхню частину. CDR у кожному ланцюгу утримуються у безпосередній близькості одна від одної за допомогою FR- ділянок і разом із CDR з іншого ланцюга беруть участь в утворенні мішень-зв'язувального центру антитіл. Див. Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md. 1987). Використовувана в даному документі нумерація амінокислотних залишків імуноглобуліну виконується згідно із системою нумерації амінокислотних залишків імуноглобуліну за Kabat et al., якщо не вказано інше.

Антитіла за даним винаходом можуть бути поліклональними, моноклональними, сконструйованими за допомогою генної інженерії та/або іншим чином модифікованими за своєю природою, включаючи без обмеження химерні антитіла, гуманізовані антитіла, людські антитіла, одноланцюгові антитіла тощо. У різних варіантах здійснення антитіла містять всю або частину константної ділянки антитіла. У деяких варіантах здійснення константна ділянка належить до ізотипу, вибраного з IgA (наприклад, IgA_1 або IgA2), IgD, IgE, IgG (наприклад, IgG_1 IgG_2, IgG_3 або IgG_4) та IgM. У конкретних варіантах здійснення антитіла, описані у даному документі, передбачають IgG_1. В інших варіантах здійснення антитіла до PD-1 передбачають IgG_2. У ще одних варіантах здійснення антитіла до PD-1 передбачають IgG_4. Використовувана в даному документі "константна ділянка" антитіла передбачає природну константну ділянку, алотипи або природні варіанти, такі як D356E та L358M або A431G в IgG_1 людини. Див., наприклад, Jefferis and Lefranc, MAbs, 1(4): 332-338 (Jul-Aug 2009).

Легка константна ділянка антитіла до PD-1 може являти собою каппа (κ) легку ділянку або лямбда (γ) ділянку. γ-Легка ділянка може належати до будь-якого з відомих підтипів, наприклад, γ_1, γ_2, γ_3 або γ_4. У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 містить каппа (κ) легку ділянку.

Термін "моноклональне антитіло", використовуваний у даному документі, не обмежується антитілами, одержаними завдяки гібридомній технології. Моноклональне антитіло одержують з одного клону, включаючи будь-який еукаріотичний, прокаріотичний або фаговий клон, за допомогою будь-яких доступних або відомих із рівня техніки способів. Моноклональні антитіла, застосовувані у випадку даного винаходу, можна одержувати із застосуванням великої кількості методик, відомих із рівня техніки, включаючи застосування гібридомної технології, рекомбінантної технології та технології фагового дисплея або їх комбінації. У багатьох шляхах застосування за даним винаходом, включаючи in vivo застосування антитіл до PD-1 у людей, відповідним чином можна використовувати химерні, гуманізовані або людські антитіла.

Використовуваний у даному документі термін "химерне" антитіло стосується антитіла, що має варіабельні послідовності, одержані з відмінного від людського імуноглобуліну, такого як щуряче або мишаче антитіло, та константні ділянки людського імуноглобуліну, вибрані, як правило, з матриці людського імуноглобуліну. Способи одержання химерних антитіл відомі з рівня техніки. Див., наприклад, Morrison, 1985, Science 229(4719): 1202-7; Oi et al, 1986, BioTechniques 4:214-221; Gillies et al, 1985, J. Immunol. Methods 125:191-202; патента США №№ 5807715; 4816567 та 4816397.

"Гуманізовані" форми відмінних від людських (наприклад, мишачих) антитіл являють собою химерні імуноглобуліни, які містять мінімальні послідовності, одержані з відмінного від людського імуноглобуліну. Загалом більшість гуманізованих антитіл будуть містити щонайменше один та, як правило, два варіабельних домени, в яких всі або практично всі ділянки CDR відповідають таким із відмінного від людського імуноглобуліну, а всі або практично всі ділянки FR мають послідовність людського імуноглобуліну. Гуманізоване антитіло також може містити щонайменше частину константної ділянки (Fc) імуноглобуліну, як правило, таку з консенсусною послідовністю людського імуноглобуліну. Способи гуманізації антитіла відомі з рівня техніки. Див., наприклад, Riechmann et al, 1988, Nature 332:323-7; патенти США №№ 5530101, 5585089, 5693761, 5693762 та 6180370 від Queen et al; EP239400, публікацію згідно з PCT WO 91/09967; патент США № 5225539; EP592106, EP519596, Padlan, 1991. Mol. Immunol., 28:489-498; Studnicka et al, 1994, Prot. Eng. 7:805-814; Roguska et al, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973; та патент США № 5565332.

"Людські антитіла" передбачають антитіла, що мають амінокислотну послідовність людського імуноглобуліну та включають антитіла, виділені з бібліотек людських імуноглобулінів або з тварин, що є трансгенними за одним або декількома людськими імуноглобулінами та які не експресують ендогенні імуноглобуліни. Людські антитіла можна одержувати різними

способами, відомими з рівня техніки, включаючи способи фагового дисплея із застосуванням бібліотек антитіл, одержаних із послідовностей людських імуноглобулінів. Див. патенти США №№ 4444887 та 4716111; та публікації згідно з PCT WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735 та WO 91/10741. Людські антитіла також можна одержати із застосуванням трансгенних мишей, які не здатні експресувати функціональні ендогенні імуноглобуліни, але які можуть експресувати гени людського імуноглобуліну. Див., наприклад, публікації згідно з PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; патенти США №№ 5413923; 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806; 5814318; 5885793; 5916771 та 5939598. Крім того, можна залучити компанії, такі як LakePharma, Inc. (Бельмонт, Каліфорнія) або Creative BioLabs (Ширлі, Нью-Йорк), для одержання людських антитіл, спрямованих на вибраний антиген, із застосуванням технології, подібної до описаної вище. Повністю людські антитіла, які розпізнають вибраний епітоп, можна створити із застосуванням методики, що називається "керований відбір". У даному підході вибране моноклональне антитіло, що не належить до людського, наприклад мишаче антитіло, застосовують для керування відбором повністю людського антитіла, що розпізнає той самий епітоп (див., Jespers et el., 1988, Biotechnology 12:899-903).

Антитіла до PD-1 за даним винаходом передбачають повно розмірні (інтактні) молекули антитіла.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу також передбачені зв'язувальні фрагменти антитіла PD-1, які здатні до специфічного зв'язування PD-1. Приклади зв'язувальних фрагментів антитіла передбачають як приклад, але без обмеження, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv-фрагменти, одноланцюгові Fv-фрагменти та однодоменні фрагменти.

Fab-фрагмент містить константний домен легкого ланцюга та перший константний домен (CH1) важкого ланцюга. Fab'-фрагменти відрізняються від Fab-фрагментів додаванням декількох залишків на карбокси-кінці домену CH1 важкого ланцюга, включаючи один або декілька цистеїнових залишків із шарнірної ділянки антитіла. F(ab')- фрагменти одержують шляхом розщеплення дисульфідного зв'язку в цистеїнових залишках шарнірної ділянки продукту пепсинового розщеплення $F(ab')_2$. Пересічним фахівцям у даній галузі відомі додаткові схеми хімічного зв'язування фрагментів антитіл. Fab- та $F(ab')_2$-фрагменти, що не містять Fc-фрагмент інтактного антитіла, швидше виводяться з кровотоку тварин та можуть характеризуватися меншим неспецифічним зв'язуванням у тканині, ніж інтактне антитіло (див., наприклад, Wahl et al, 1983, J. Nucl. Med. 24:316).

"Fv"-фрагмент являє собою мінімальний фрагмент антитіла, який містить повний центр розпізнавання та зв'язування мішені. Цю ділянку складає димер з одного варіабельного домену важкого ланцюга та одного варіабельного домену легкого ланцюга в щільному нековалентному зв'язку (димер V_H-V_L). Вони перебувають у такій конфігурації, що три CDR кожного варіабельного домену взаємодіють з утворенням мішень-зв'язувального центру на поверхні димеру V_H-V_L. Часто шість CDR забезпечують мішень-зв'язувальну специфічність антитіла. Однак у деяких випадках навіть один варіабельний домен (або половина Fv, що містить тільки три CDR, специфічні щодо мішені) може характеризуватися здатністю розпізнавати та зв'язувати мішень, хоча і з нижчою афінністю, ніж весь центр зв'язування.

"Одноланцюговий Fv" або "scFv" зв'язувальні фрагменти антитіла містять домени V_H та V_L антитіла, причому ці домени присутні в одному поліпептидному ланцюгу. Зазвичай поліпептид Fv додатково містить поліпептидний лінкер між доменами V_H та V_L, який дає змогу scFv утворювати структуру, необхідну для зв'язування мішені.

"Однодоменні антитіла" складаються з одного домену V_H або V_L, які проявляють достатній ступінь афінності щодо PD-1. У конкретному варіанті здійснення одно доменне антитіло являє собою камелізоване антитіло (див., наприклад, Riechmann, 1999, Journal of Immunological Methods 231:25-38).

Антитіла до PD-1 за даним винаходом передбачають деривативізовані антитіла. Наприклад, але без обмеження, деривативізовані антитіла, як правило, модифіковані за допомогою глікозилювання, ацетилювання, пегілювання, фосфорилювання, амідування, деривативізації за допомогою відомих захисних/блокувальних груп, протеолітичного розщеплення та утворення зв'язку з клітинним лігандом або іншим білком. Будь-яку з багатьох хімічних модифікацій можна проводити за допомогою відомих методик, що включають без обмеження специфічне хімічне розщеплення, ацетилювання, формілювання, метаболічний синтез тунікаміцину тощо. Крім того, похідна може містити одну або декілька неприродних амінокислот, наприклад, із застосуванням технології Ambrx (див., наприклад, Wolfson, 2006, Chem. Biol. 13(10):1011-2).

Антитіла до PD-1 або зв'язувальні фрагменти можуть являти собою антитіла або фрагменти, послідовності яких були модифіковані для зміни щонайменше однієї біологічної

ефекторної функції, що опосередковується константною ділянкою. Наприклад, у деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 може бути модифіковане для послаблення щонайменше однієї біологічної ефекторної функції, опосередкованої константною ділянкою, порівняно з немодифікованим антитілом, наприклад, послаблення зв'язування з одним або декількома Fc-рецепторами (FcγR), такими як FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA та/або FcγRIIIB. Зв'язування з FcγR може бути ослаблене за рахунок мутації сегмента константної ділянки імуноглобуліну антитіла в певних ділянках, необхідних для взаємодій із FcγR (див., наприклад, Canfield and Morrison, 1991, J. Exp. Med. 173:1483-1491; та Lund et al, 1991, J. Immunol. 147:2657-2662). Під час ослаблення здатності антитіла до зв'язування FcγR також можуть послаблюватися інші ефекторні функції, які базуються на взаємодіях із FcγR, такі як опсонізація, фагоцитоз та антигензалежна клітинна цитотоксичність ("ADCC").

Антитіло до PD-1 або зв'язувальний фрагмент, описані в даному документі, передбачають антитіла, які були модифіковані для набуття або поліпшення щонайменше однієї біологічної ефекторної функції, опосередкованої константною ділянкою, порівняно з не модифікованим антитілом, наприклад, поліпшення взаємодій із FcγR (див., наприклад, заявку на патент США № 2006/0134709). Наприклад, антитіло до PD-1 за даним винаходом може мати константну ділянку, яка зв'язує FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA та/або FcγRIIIB з більшою афінністю, ніж відповідна константна ділянка дикого типу.

Таким чином, антитіла за даним винаходом можуть характеризуватися змінами в біологічній активності, які спричиняють збільшення або зменшення опсонізації, фагоцитозу або ADCC. Такі зміни відомі з рівня техніки. Наприклад, модифікації антитіл, які послаблюють активність ADCC, описані в патенті США № 5834597. Ілюстративний варіант, що знижує ADCC, відповідає "мутанту 3" (також відомому як "M3", показаному на Фіг. 4 патенту США № 5834597), в якому залишки 234 та 237 (із використанням нумерації EU) заміщені аланіновими залишками. Мутантний варіант 3 (також відомий як "M3") може бути використаний у цілій низці ізотипів антитіл, наприклад IgG_2.

Додаткові заміни, які можуть модифікувати зв'язування з FcγR та/або ADCC-ефекторну функцію антитіла до PD-1, включають заміну K322A або подвійну заміну L234A та L235A у ділянці Fc. Див., наприклад, Hezareh, et al. J. Virol., 75 (24): 12161-12168(2001).

У деяких варіантах здійснення антитіла до PD-1 за даним винаходом характеризуються низькими рівнями фукози або її відсутністю. Відсутність фукози в антитілах корелювала з підвищеною активністю ADCC, особливо за низьких доз антитіла. Див. Shields et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Shinkawa et al, 2003, J. Biol. Chem. 278:3466-73. Способи одержання антитіл, що не містять фукозу, передбачають одержання у клітинах мієломи щура YB2/0 (ATCC CRL 1662). Клітини YB2/0 характеризуються низьким рівнем експресії мРНК FUT8, яка кодує α-1,6-фукозилтрансферазу, фермент, необхідний для фукозилювання поліпептидів.

Антитіла до PD-1 за даним винаходом можуть містити модифіковані домени CH2 або цілі домени Fc (або їхні варіанти), які включають амінокислотні заміни, що збільшують зв'язування з FcγRIIB та/або послаблюють зв'язування з FcγRIIIA порівняно зі зв'язуванням відповідного CH2 або ділянки Fc дикого типу. Варіантні домени CH2 або варіантні домени Fc були описані в заявці на патент США № 2014/0377253. Варіантний домен CH2 або варіантний домен Fc, як правило, включають одну або декілька замін у положенні 263, положенні 266, положенні 273 та положенні 305, при цьому нумерація залишків у домені Fc наведена згідно з EU-індексом за Kabat. У деяких варіантах здійснення антитіла до PD-1 містять одну або декілька замін відносно домену CH2 дикого типу, які вибрані з V263L, V266L, V273C, V273E, V273F, V273L, V273M, V273S, V273Y, V3O5K та V305W. У конкретних варіантах здійснення одна або декілька замін у домені CH2 відносно домену CH2 IgGi людини вибрані з V263L, V273E, V273F, V273M, V273S та V273Y. Наприклад, одна або декілька замін у домені CH2 IgG_1 може являти собою V273E. У іншому конкретному варіанті здійснення антитіло до PD-1 за даним винаходом містить варіантну шарнірну ділянку IgG_1, яка містить амінокислотну заміну V263L.

Інші приклади варіантних доменів CH2 або варіантних доменів Fc, які можуть забезпечити посилене зв'язування з FcγRIIB та/або ослаблене зв'язування з FcγRIIIA порівняно зі зв'язуванням відповідної ділянки CH2 або Fc дикого типу, включають приклади з Vonderheide et al. Clin. Cancer Res., 19 (5), 1035-1043 (2013), такі як S267E або S267E/L328F у IgG_1 людини.

Антитіла до PD-1 або зв'язувальні фрагменти, які містять константну ділянку IgG_4 людини, можуть містити мутацію S228P, яка, як повідомлялося, запобігає обміну плечима Fab. Див., наприклад, Silva, JP et al. Journal of Biological Chemistry, 290(9), 5462-5469(2015).

У деяких варіантах здійснення антитіла до PD-1 або зв'язувальні фрагменти включають модифікації, які збільшують або зменшують їхню афінність зв'язування з фетальним Fc-рецептором FcRn, наприклад, за рахунок мутації сегмента константної ділянки імуноглобуліну в

певних ділянках, залучених до взаємодій з FcRn (див., наприклад, WO 2005/123780). У конкретних варіантах здійснення антитіло до PD-1 класу IgG було піддано мутації таким чином, що щонайменше один з амінокислотних залишків 250, 314 та 428 константної ділянки важкого ланцюга був заміщений сам по собі або в будь-яких їх комбінаціях, як, наприклад, у положеннях 250 та 428, або в положеннях 250 та 314, або в положеннях 314 та 428, або в положеннях 250, 314 та 428, при цьому конкретною комбінацією є положення 250 та 428. У положенні 250 замісним амінокислотним залишком може бути будь-який амінокислотний залишок, відмінний від треоніну, включаючи без обмеження аланін, цистеїн, аспарагінову кислоту, глутамінову кислоту, фенілаланін, гліцин, гістидин, ізолейцин, лізин, лейцин, метіонін, аспарагін, пролін, глутамін, аргінін, серин, валін, триптофан або тирозин. У положенні 314 замісним амінокислотним залишком може бути будь-який амінокислотний залишок, відмінний від лейцину, включаючи без обмеження аланін, цистеїн, аспарагінову кислоту, глутамінову кислоту, фенілаланін, гліцин, гістидин, ізолейцин, лізин, метіонін, аспарагін, пролін, глутамін, аргінін, серин, треонін, валін, триптофан або тирозин. У положенні 428 замісними амінокислотними залишками може бути будь-який амінокислотний залишок, відмінний від метіоніну, включаючи без обмеження аланін, цистеїн, аспарагінову кислоту, глутамінову кислоту, фенілаланін, гліцин, гістидин, ізолейцин, лізин, лейцин, аспарагін, пролін, глутамін, аргінін, серин, треонін, валін, триптофан або тирозин. Ілюстративною заміною, яка, як відомо, модифікує ефекторну функцію Fc, є заміна M428L у Fc, яка може траплятися в комбінації із заміною T250Q у Fc. Додаткові конкретні комбінації придатних амінокислотних замін визначені в таблиці 1 патенту США № 7217797. Такі мутації збільшують зв'язування з FcRn, що захищає антитіло від руйнування та збільшує період його напівжиття.

Антитіло до PD-1 може мати одну або декілька амінокислот, вставлених в одну або декілька з його CDR, наприклад, як описано в Jung and Plückthun, 1997, Protein Engineering 10:9, 959-966; Yazaki et al, 2004, Protein Eng. Des Sel. 17(5):481-9. Epub 2004 Aug 17; та заявці на патент США № 2007/0280931.

Антитіла до PD-1 з високою афінністю щодо PD-1 людини можуть бути бажаними для терапевтичних та діагностичних шляхів застосування. Відповідно, у даному винаході розглядаються антитіла, що характеризуються високою афінністю зв'язування з PD-1 людини. У конкретних варіантах здійснення антитіла до PD-1, які зв'язують PD-1 людини, характеризуються афінністю, що становить щонайменше приблизно 100 нМ, але можуть проявляти вищу афінність, наприклад, щонайменше приблизно 90 нМ, 80 нМ, 70 нМ, 60 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 25 нМ, 20 нМ, 15 нМ, 10 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0,1 нМ, 0,01 нМ або навіть вищу. У деяких варіантах здійснення антитіла зв'язують PD-1 людини з афінністю, що варіює в діапазоні від приблизно 1 пМ до приблизно 100 нМ, або афінністю, що варіює в діапазоні між будь-якими з вищевказаних величин.

Афінність антитіл до PD-1 щодо PD-1 людини можна визначати із застосуванням методик, добре відомих із рівня техніки або описаних у даному документі, таких як, наприклад, але без обмеження, ELISA, ізотермічна титраційна калориметрія (ITC), поверхневий плазмонний резонанс або флуоресцентний поляризаційний аналіз.

Антитіла до PD-1 зазвичай містять важкий ланцюг, що містить варіабельну ділянку (V_H), яка має три ділянки ("CDR"), що визначають комплементарність, які називаються в даному документі (у порядку N→C) CDR№ 1 V_H, CDR № 2 V_H та CDR № 3 V_H, та легкий ланцюг, що містить варіабельну ділянку (V_L), яка має три ділянки, що визначають комплементарність, які називаються в даному документі (у порядку N→C) CDR№ 1 V_L, CDR № 2 V_L та CDR№ 3 V_L. У даному документі представлені амінокислотні послідовності ілюстративних CDR, а також амінокислотні послідовності ділянок V_H та V_L важкого та легкого ланцюгів ілюстративних антитіл до PD-1. Конкретні варіанти здійснення антитіл до PD-1 передбачають такі ілюстративні послідовності CDR, та/або V_H, та/або V_L, а також антитіла, які конкурують за зв'язування PD-1 людини з такими антитілами.

У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 є придатним для введення людині. У конкретному варіанті здійснення антитіло до PD-1 є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення амінокислотні послідовності CDR антитіла до PD-1 вибрані з наступних послідовностей.

CDR	Послідовність (N→C)	Ідентифікатор
CDR№ 1 V_H:	GYTFTHYGMN	(SEQIDNO:11)
CDR№ 2 V_H:	WVNTYTGEPTYADDFKG	(SEQIDNO:12)
CDR № 3 V_H:	EGEGLGFGD EGEGIGFGD EGEGVGFGD EGEGMGFGD	(SEQIDNO:13) (SEQIDNO:21) (SEQ ID NO:22) (SEQ ID NO:23)
CDR№ 1 V_L:	RSSQSIVHSHGDTYLE	(SEQ ID NO:14)
CDR № 2 V_L:	KVSNRFS	(SEQ ID NO:15)
CDR № 3 V_L:	FQGSHIPVT	(SEQ ID NO: 16)

Конкретні ілюстративні варіанти здійснення антитіл до PD-1 з вищевказаними CDR описані в даному документі. У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 має CDR під SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 та 16. У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 має CDR під SEQ ID NO: 11, 12, 21, 14, 15 та 16. У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 має CDR під SEQ ID NO: И, 12, 22, 14, 15 та 16. У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 має CDR під SEQ ID NO: 11, 12, 23, 14, 15 та 16.

У деяких варіантах здійснення кожна CDR антитіла до PD-1 незалежно від інших вибрана таким чином, що її послідовність відповідає відповідній CDR антитіла, наведеного в таблиці 3. У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 являє собою IgG та має V_H та V_L, послідовність яких відповідає V_H та V_L антитіла, наведеного в таблиці 3.

У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 містить ланцюг V_H, послідовність якого відповідає SEQ ID NO:31; та ланцюг V_L, послідовність якого відповідає SEQ ID NO:41. У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 містить ланцюг V_H, послідовність якого відповідає SEQ ID NO:32; та ланцюг V_L, послідовність якого відповідає SEQ ID NO:42. У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 містить ланцюг V_H, послідовність якого відповідає SEQ ID NO:33, та ланцюг V_L, послідовність якого відповідає SEQ ID NO:42. У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 містить ланцюг V_H, послідовність якого відповідає SEQ ID NO:34; та ланцюг V_L, послідовність якого відповідає SEQ ID NO:42. У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 містить ланцюг V_H, послідовність якого відповідає SEQ ID NO:35; та ланцюг V_L, послідовність якого відповідає SEQ ID NO:42. У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 містить ланцюг V_H, послідовність якого відповідає SEQ ID NO:36; та ланцюг V_L, послідовність якого відповідає SEQ ID NO:42.

Фахівцю у даній галузі буде зрозуміло, що певні мутації у послідовності V_H або V_L антитіла до PD-1, описаного у даному документі, допускають перебування антитіл до PD-1 у межах обсягу даного винаходу. Мутації можуть включати амінокислотні заміни, додавання або делеції у послідовності V_H або V_L, розкритої у даному документі, зі збереженням значної активності проти PD-1. Відповідно, у деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 містить послідовність V_H, яка характеризується щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, щонайменше 93 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичністю послідовності із послідовністю V_H будь-якого з антитіл, показаних у таблиці 3. Антитіло до PD-1 може містити послідовність V_H, яка має до 8, до 7, до 6, до 5, до 4, до 3 або до 2 мутацій порівняно з послідовністю V_H будь-якого з антитіл, показаних у таблиці 3. У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 може містити послідовність V_H, яка має 5 або менше, 4 або менше, 3 або менше або 2 або менше мутацій порівняно з послідовністю V_H будь-якого з антитіл, показаних у таблиці 3. У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 містить послідовність V_L, яка характеризується щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, щонайменше 93 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичністю послідовності із послідовністю V_L будь-якого з антитіл, показаних у таблиці 3. Антитіло до PD-1 може містити послідовність V_L, яка має до 8, до 7, до 6, до 5, до 4, до 3 або до 2 мутацій порівняно з послідовністю V_L будь-якого з антитіл, показаних у таблиці 3. У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 може містити послідовність V_L, яка має 5 або менше, 4 або менше, 3 або менше або 2 або менше мутацій порівняно з послідовністю V_L. будь-якого з антитіл, показаних у таблиці 3.

У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга згідно з:

EIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTHYGMNWVRQAPGQGLEWVGW
VNTYTGEPTYADDFKGRLTFTLDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGEGLGFGD
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV

HTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:51);

та амінокислотну послідовність легкого ланцюга згідно з:

DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSHGDTYLEWYLQKPGQSPQLLIY
KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPVTFGQGTKLEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:61),

де підкреслені амінокислоти представляють CDR, а виділені курсивом амінокислоти представляють константні ділянки.

На С-кінці важкого ланцюга антитіла можуть траплятися посттрансляційні модифікації послідовностей антитіла до PD-1, такі як відщеплення одного або декількох (наприклад, 1, 2, 3 або більше) амінокислотних залишків.

У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга згідно з:

EIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTHYGMNWVRQAPGQGLEWVGW
VNTYTGEPTYADDFKGRLTFTLDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTREGEGLGFGD
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:52);

та амінокислотну послідовність легкого ланцюга згідно з:

DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSHGDTYLEWYLQKPGQSPQLLIY
KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPVTFGQGTKLEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO.61),

де підкреслені амінокислоти представляють CDR, а виділені курсивом амінокислоти представляють константні ділянки.

Додаткові посттрансляційні модифікації антитіла до PD-1 можуть включати глікозилювання. Звичайні двохантенні комплекси можуть складатися із серцевинної структури, яка має два залишки N-ацетилглюкозаміну (GlcNAc), три залишки манози та два залишки G1cNAc, які з'єднані β-1,2-зв'язком із α-6-манозою і α-3-манозою з утворенням двох антен. До серцевини можуть бути приєднані один або декілька залишків фукози (Fuc), галактози (Gal), високоманозних гліканів Man-5 або Man-9, G1cNAc у точках розгалуження та сіалової кислоти, включаючи залишки N-ацетилнейрамінової кислоти (NANA) або N-гліколілнейрамінової кислоти (NGNA). N- зв'язані глікоформи можуть включати G0 (білок, що має серцевинну двохантенну глікозильовану структуру), G0F (фукозильований G0), G0F-G1cNAc, G1 (білок, що має серцевинну глікозильовану структуру з одним залишком галактози), G1F (фукозильований G1), G2 (білок, що має серцевинну глікозильовану структуру з двома залишками галактози) та/або G2F (фукозильований G2). У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 має глікан GOF.

У деяких варіантах здійснення антитіла до PD-1 конкурують із еталонним антитілом за зв'язування PD-1 людини в in vitro аналізах. У деяких варіантах здійснення антитіла до PD-1 конкурують за зв'язування PD-1 людини на клітинах, що експресують PD-1 людини. Еталонне антитіло може являти собою будь-яке з антитіл до PD-1, описаних у даному документі. У деяких варіантах здійснення еталонне антитіло являє собою антитіло, наведене в таблиці 3. У конкретних варіантах здійснення еталонне антитіло вибране з мишачого антитіла 12A11 ("Mu12A11"). У деяких варіантах здійснення еталонне антитіло являє собою гуманізовану версію Mu12A11. У конкретному варіанті здійснення еталонне антитіло являє собою гуманізоване антитіло 12A11.1b("Hu12A11b") або гуманізоване антитіло 12A11.2b M99L ("Hu12A11.2b4").

У деяких варіантах здійснення антитіла до PD-1 здійснюють антагоністичний вплив на PD-1 людини (SEQ ID NO:1), наприклад, інгібують його. Антагонізм щодо рецептора PD-1 може відбуватися за рахунок цілої низки механізмів, наприклад, шляхом інгібування зв'язування PD-1 із PD-L1 (SEQ ID NO:3) або PD-L2 (SEQ ID NO:4) людини.

Антитіла до PD-1, описані в даному документі, зазвичай специфічно зв'язуються з PD-1 людини. Перехресна реактивність антитіл під час зв'язування PD-1 від інших видів, наприклад мавпи, наприклад макаки-крабоїда, може забезпечувати такі переваги, як можливість

тестування біологічної активності на тваринних моделях у вигляді мавп. Таке тестування на тваринній моделі можна застосовувати для скринінгу антитіл до PD-1 для відбору щодо властивостей, пов'язаних із ефективністю, наприклад, сприятливих фармакокінетичних параметрів, або властивостей, пов'язаних із безпекою, наприклад, зниженою гепатотоксичністю. У деяких варіантах здійснення антитіла до PD-1 зв'язуються з PD-1 макаки-крабоїда, а також PD-1 людини.

Аналізи конкурентного зв'язування включають без обмеження імунологічний аналіз із міченням радіоактивною речовиною (RIA), твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA), сендвіч-ELISA, аналізи за методом сортування клітин з активованою флуоресценцією (FACS) та аналізи за методом поверхневого плазмонного резонансу.

Під час проведення аналізу конкурентного зв'язування антитіл між еталонним антитілом і досліджуваним антитілом (незалежно від виду або ізотипу) спочатку можна помітити еталонне антитіло за допомогою детектовної мітки, такої як флуорофор, біотин, або ферментативної (або навіть радіоактивної) мітки для забезпечення можливості подальшої ідентифікації. У цьому випадку клітини, що експресують PD-1 людини, інкубують із немміченим досліджуваним антитілом, додають мічене еталонне антитіло та вимірюють інтенсивність зв'язаної мітки. Якщо досліджуване антитіло конкурує з міченим еталонним антитілом внаслідок зв'язування з епітопом, що перекривається, інтенсивність буде знижуватися порівняно з контрольною реакцією, що проводиться без досліджуваного антитіла.

У конкретному варіанті здійснення даного аналізу спочатку визначають концентрацію міченого еталонного антитіла, яка спричиняє 80 % від максимального зв'язування ("конц.$_{80\ \%}$") за умов проведення аналізу (наприклад, за визначеної щільності клітин), та аналіз конкурентного зв'язування здійснюють із 10X конц.$_{80\ \%}$ немміченого досліджуваного антитіла та конц.$_{80\ \%}$ міченого еталонного антитіла.

Інгібування можна виразити як константу інгібування або K_i яку розраховують за такою формулою:

$K_i = IC_{50}/(1 + [\text{концентрація еталонного Ab}]/K_d)$,

де IC_{50} являє собою концентрацію досліджуваного антитіла, яка спричиняє 50 % послаблення зв'язування еталонного антитіла, а K_d являє собою константу дисоціації еталонного антитіла, показник його афінності щодо PD-1 людини. Антитіла, які конкурують з антитілами до PD-1, розкритими в даному документі, можуть характеризуватися K_i, що становить від 10 пМ до 10 нМ за умов аналізу, описаного в даному документі.

У різних варіантах здійснення вважається, що досліджуване антитіло конкурує з еталонним антитілом, якщо воно зменшує зв'язування еталонного антитіла на щонайменше приблизно 20 % або більше, наприклад, на щонайменше приблизно 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або навіть більше або на процент, що варіює в діапазоні між будь-якими з вищевказаних величин, за концентрації еталонного антитіла, яка передбачає 80 % від максимального зв'язування за конкретних умов аналізу, та концентрації досліджуваного антитіла, яка в 10 разів перевищує концентрацію еталонного антитіла.

Конкретний аналіз та умови аналізу, придатні для проведення оцінки того, чи конкурує антитіло за зв'язування PD-1 людини з еталонним антитілом, як описано у даному документі, наведені у розділі 8.1.5.

7.4. Полінуклеотиди, що кодують антитіла до PD-1, системи експресії та способи одержання антитіл

Даний винахід охоплює молекули нуклеїнової кислоти, що кодують гени легкого та важкого ланцюгів імуноглобуліну для антитіл до PD-1, вектори, що містять такі нуклеїнові кислоти, та клітини-хазяїни, здатні продукувати антитіла до PD-1 за даним винаходом.

Антитіло до PD-1 за даним винаходом може бути одержане внаслідок рекомбінантної експресії генів легкого та важкого ланцюгів імуноглобуліну в клітині-хазяїні. Під час рекомбінантної експресії антитіла клітину-хазяїна трансфікують одним або декількома рекомбінантними векторами експресії, що несуть фрагменти ДНК, які кодують легкий та важкий ланцюги імуноглобуліну для антитіла, внаслідок чого легкий та важкий ланцюги експресуються в клітині-хазяїні та необов'язково секретуються в середовище, в якому культивуються клітини-хазяїни, при цьому з даного середовища можна виділяти антитіла. Для одержання генів важкого та легкого ланцюгів антитіла, вбудовування даних генів у рекомбінантні вектори експресії та введення векторів у клітини-хазяїни застосовують стандартні методики рекомбінантної ДНК, такі як описані в Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition (Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M. et al, eds., Greene Publishing Associates, 1989) та в патенті США № 4816397.

Для одержання нуклеїнових кислот, що кодують такі антитіла до PD-1, спочатку одержують фрагменти ДНК, що кодують варіабельні ділянки легкого та важкого ланцюгів. Дані ДНК можна одержати шляхом ампліфікації та модифікації ДНК зародкового типу або кДНК, що кодує послідовності варіабельних ділянок легкого та важкого ланцюгів, наприклад, із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). З рівня техніки відомі послідовності ДНК зародкового типу для генів варіабельних ділянок важкого та легкого ланцюгів людини (див., наприклад, базу даних послідовностей зародкового типу людини "VBASE"; див. також Kabat, E. A. et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson et al., 1992, J. Mol. Biol. 22T:116-198; та Cox et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:827-836; вміст кожної з яких включений у даний документ за допомогою посилання).

Після одержання фрагментів ДНК, що кодують сегменти V_H та V_L, пов'язані з антитілом до PD-1, такі фрагменти ДНК можна додатково піддати маніпуляціям за допомогою стандартних методик рекомбінантної ДНК, наприклад, для перетворення генів варіабельної ділянки на гени повнорозмірного ланцюга антитіла, гени Fab-фрагмента або ген scFv. Під час таких маніпуляцій фрагмент ДНК, що кодує V_L або V_H, функціонально зв'язують з іншим фрагментом ДНК, що кодує інший білок, такий як константна ділянка антитіла або гнучкий лінкер. Передбачається, що термін "функціонально зв'язаний", використовуваний у даному контексті, означає, що два фрагменти ДНК з'єднані таким чином, що амінокислотні послідовності, які кодуються цими двома фрагментами ДНК, залишаються в межах рамки зчитування.

Виділену ДНК, що кодує ділянку V_H, можна перетворити на ген повно розмірного важкого ланцюга шляхом функціонального зв'язування ДНК, що кодує V_H, з іншою молекулою ДНК, яка кодує константні ділянки важкого ланцюга (CH1, CH2, CH3 та необов'язково CH4). Послідовності генів константних ділянок важкого ланцюга людини відомі з рівня техніки (див., наприклад. Kabat, E.A., et al, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), та фрагменти ДНК, що охоплюють дані ділянки, можна одержати за допомогою стандартної ПЛР-ампліфікації. Константна ділянка важкого ланцюга може являти собою константну ділянку IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA, IgE, IgM або IgD, але в певних варіантах здійснення вона являє собою IgG_1 або IgG_4. Для одержання гена важкого ланцюга Fab-фрагмента ДНК, що кодує V_H, можна функціонально зв'язати з іншою молекулою ДНК, яка кодує тільки константну ділянку CH1 важкого ланцюга.

Виділену ДНК, що кодує ділянку V_L, можна перетворити на ген повно розмірного легкого ланцюга (а також ген легкого ланцюга Fab) шляхом функціонального зв'язування ДНК, яка кодує V_L, з іншою молекулою ДНК, що кодує константну ділянку легкого ланцюга, CL. Послідовності генів константних ділянок легкого ланцюга людини відомі з рівня техніки (див., наприклад, Kabat, et al, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), та фрагменти ДНК, що охоплюють дані ділянки, можна одержати за допомогою стандартної ПЛР-ампліфікації. Константна ділянка легкого ланцюга може являти собою константну ділянку каппа-ланцюга або лямбда-ланцюга, але в певних варіантах здійснення вона являє собою константну ділянку каппа-ланцюга. Для створення гена scFv фрагменти ДНК, що кодують V_H та V_L, функціонально зв'язують з іншим фрагментом, що кодує гнучкий лінкер, наприклад, що кодує амінокислотну послідовність $(Gly_4{\sim}Ser)_3$ (SEQ ID NO:5), таким чином, щоб послідовності V_H та V_L могли експресуватися як безперервний одноланцюговий білок із ділянками V_L та V_H, з'єднаними гнучким лінкером (див., наприклад, Bird et al, 1988, Science 242:423-426; Huston et al, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al, 1990, Nature 348:552-554).

Для експресії антитіл до PD-1 за даним винаходом ДНК, що кодують неповні або повно розмірні легкий і важкий ланцюги, одержані, як описано вище, вставляють у вектори експресії, унаслідок чого гени стають функціонально зв'язаними з послідовностями контролю транскрипції та трансляції. У даному контексті передбачається, що термін "функціонально зв'язаний" означає, що ген антитіла лігують у вектор таким чином, щоб послідовності контролю транскрипції та трансляції всередині вектора виконували свою передбачувану функцію, що полягає в регулюванні транскрипції та трансляції гена антитіла. Вектор експресії та послідовності, що контролюють експресію, підбирають таким чином, щоб вони були сумісними з використовуваною для експресії клітиною-хазяїном. Ген легкого ланцюга антитіла та ген важкого ланцюга антитіла можна вставляти в окремі вектори, або, що більш типово, обидва гени вставляють у той самий вектор експресії.

Гени антитіла вставляють у вектор експресії за допомогою стандартних способів (наприклад, шляхом лігування комплементарних сайтів рестрикції на фрагменті гена антитіла та векторі або шляхом лігування "тупих" кінців, якщо сайти рестрикції відсутні). До вставки

послідовностей легкого або важкого ланцюгів, пов'язаних з антитілом до PD-1, вектор експресії вже може нести послідовності константних ділянок антитіла. Наприклад, один підхід до перетворення послідовностей V_H та V_L, пов'язаних із моноклональними антитілами до PD-1, на гени повнорозмірного антитіла полягає в тому, щоб вставити їх у вектори експресії, які вже кодують константні ділянки важкого та легкого ланцюга відповідно, унаслідок чого сегмент V_H функціонально зв'язується із сегментом(сегментами) CH усередині вектора, а сегмент V_L функціонально зв'язується із сегментом CL усередині вектора. Додатково або альтернативно рекомбінантний вектор експресії може кодувати сигнальний пептид, який сприяє секреції ланцюга антитіла з клітини-хазяїна. Ген ланцюга антитіла можна клонувати у вектор таким чином, щоб сигнальний пептид був зв'язаний у рамці зчитування з амінокінцем ланцюга антитіла, що кодується геном. Сигнальний пептид може являти собою сигнальний пептид імуноглобуліну або гетерологічний сигнальний пептид (тобто сигнальний пептид від відмінного від імуноглобуліну білка).

Окрім генів ланцюга антитіла рекомбінантні вектори експресії за даним винаходом несуть регуляторні послідовності, які контролюють експресію генів ланцюга антитіла в клітині-хазяїні. Передбачається, що термін "регуляторна послідовність" включає промотори, енхансери та інші елементи контролю експресії (наприклад, сигнали поліаденілювання), які забезпечують контроль транскрипції або трансляції генів ланцюгів антитіла. Такі регуляторні послідовності описані, наприклад, у Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990. Фахівцям у даній галузі буде зрозуміло, що конструювання вектора експресії, у тому числі вибір регуляторних послідовностей, може залежати від таких факторів, як вибір клітини-хазяїна, що підлягає трансформації, необхідний рівень експресії білка тощо. Придатні регуляторні послідовності для експресії в клітинах-хазяїнах, одержаних від ссавців, включають вірусні елементи, що спричиняють високі рівні експресії білка в клітинах ссавців, такі як промотори та/або енхансери, одержані з цитомегаловірусу (CMV) (такі як промотор/енхансер CMV), вірусу мавп 40 (SV40) (такі як промотор/енхансер SV40), аденовірусу (наприклад, головний пізній промотор аденовірусу (AdMLP)) та вірусу поліоми. Детальніший опис вірусних регуляторних елементів та їхніх послідовностей див., наприклад, у патенті США № 5168062 від Stinski, патенті США № 4510245 від Bell et al. та патенті США № 4968615 від Schaffher etal.

Додатково до генів ланцюга антитіла та регуляторних послідовностей рекомбінантні вектори експресії за даним винаходом можуть нести додаткові послідовності, такі як послідовності, які регулюють реплікацію вектора в клітинах-хазяїнах (наприклад, точки початку реплікації), та гени селектовних маркерів. Ген селектовного маркера полегшує відбір клітин-хазяїнів, в які був введений вектор (див., наприклад, патенти США №№ 4399216, 4634665 та 5179017, усі від Axel et al). Наприклад, як правило, ген селектовного маркера надає клітині-хазяїну, в яку був введений вектор, стійкість до лікарських засобів, таких як G418, гігроміцин або метотрексат. Придатні гени селектовних маркерів передбачають ген дигідрофолатредуктази (DHFR) (для застосування в $DHFR^-$ клітинах-хазяїнах із відбором/ампліфікацією під дією метотрексату) та ген пео (для відбору за G418). Для експресії легкого та важкого ланцюгів вектор(вектори) експресії, що кодує(кодують) важкий і легкий ланцюги, вводять у клітину-хазяїна шляхом трансфекції за допомогою стандартних методик. Передбачається, що різні форми терміну "трансфекція" охоплюють широкий спектр методик, які зазвичай застосовуються для введення екзогенної ДНК у прокаріотичну або еукаріотичну клітину-хазяїна, наприклад, електропорацію, ліпофекцію, осадження за допомогою фосфату кальцію, трансфекцію, опосередковану DEAE-декстраном, тощо.

Антитіла за даним винаходом можна експресувати або в прокаріотичних, або в еукаріотичних клітинах-хазяїнах. У певних варіантах здійснення експресія антитіл здійснюється в еукаріотичних клітинах, наприклад клітинах-хазяїнах, одержаних від ссавців, з оптимальною секрецією належним чином згорнутого та імунологічно активного антитіла. Ілюстративні клітини-хазяїни, одержані від ссавців, для експресії рекомбінантних антитіл за даним винаходом включають клітини яєчників китайського хом'ячка (CHO) (включаючи клітини $DHFR^-$ CHO, описані в Urlaub and Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, застосовувані із селектовним маркером DHFR, наприклад, як описано в Kaufman and Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601-621), клітини мієломи NSO, клітини COS та клітини SP2. Коли рекомбінантні вектори експресії, які кодують гени антитіла, вводяться в клітини-хазяїни, одержані від ссавців, антитіла одержують шляхом культивування клітин-хазяїнів протягом періоду часу, достатнього для забезпечення можливості експресії антитіла в клітинах-хазяїнах або секреції антитіла в культуральне середовище, в якому клітини-хазяїни вирощуються. Антитіла можна виділяти з культурального середовища із застосуванням стандартних способів очищення білка. Клітини-

хазяїни також можна застосовувати для одержання частин інтактних антитіл, таких як Fab-фрагменти або молекули scFv. Зрозуміло, що видозміни вищеописаної процедури перебувають у межах обсягу даного винаходу. Наприклад, може бути потрібною трансфекція клітини-хазяїна за допомогою ДНК, що кодує або легкий ланцюг, або важкий ланцюг (але не обидва) антитіла до PD-1 за даним винаходом.

Технологію рекомбінантної ДНК також можна застосовувати для видалення деяких або всіх ДНК, що кодують будь-який один або обидва з легкого та важкого ланцюгів, які не є необхідними для зв'язування PD-1 людини. Антитіла за даним винаходом також охоплюють молекули, експресовані з таких усічених молекул ДНК.

Для рекомбінантної експресії антитіла до PD-1 за даним винаходом можна здійснювати спільну трансфекцію клітини-хазяїна за допомогою двох векторів експресії за даним винаходом, першого вектора, що кодує поліпептид, одержаний із важкого ланцюга, та другого вектора, що кодує поліпептид, одержаний із легкого ланцюга. Два вектори можуть містити ідентичні селектовні маркери, або кожний із них може містити окремий селектовний маркер. Альтернативно, можна застосовувати один вектор, який кодує поліпептиди як важкого, так і легкого ланцюгів.

Після того, як була одержана нуклеїнова кислота, яка кодує одну або декілька частин антитіла до PD-1, у кодувальну послідовність можна вводити додаткові зміни або мутації, наприклад, для створення нуклеїнових кислот, які кодують антитіла з різними послідовностями CDR, антитіла зі зменшеною афінністю щодо Fc-рецептора або антитіла різних підкласів.

Антитіла до PD-1 за даним винаходом також можуть бути одержані за рахунок хімічного синтезу (наприклад, за допомогою способів, описаних у Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., 1984 The Pierce Chemical Co., Rockford, III.). Варіантні антитіла також можуть бути одержані із застосуванням без клітинної платформи (див., наприклад, Chu et al, Biochemia No. 2, 2001 (Roche Molecular Biologicals) та Murray et ah, 2013, Current Opinion in Chemical Biology, 17:420-426).

Після того як антитіло до PD-1 за даним винаходом було одержане за рахунок рекомбінантної експресії, його можна очистити за допомогою будь-якого відомого з рівня техніки способу очищення молекули імуноглобуліну, наприклад, за допомогою хроматографії (наприклад, іонообмінної, афінної та ексклюзійної колонкової хроматографії), центрифугування, методики, що базується на різній розчинності, або будь-якої іншої стандартної методики для очищення білків. Крім того, для полегшення очищення антитіла до PD-1 за даним винаходом можна зливати з гетерологічними поліпептидними послідовностями, описаними в даному документі або іншим чином відомими з рівня техніки.

Після виділення антитіла до PD-1 за необхідності його можна піддавати додатковому очищенню, наприклад, за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (див., наприклад, Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology, Work and Burdon, eds., Elsevier, 1980) або гель-фільтраційної хроматографії на колонці Superdex™ 75 (Pharmacia Biotech AB, Уппсала, Швеція).

7.5. Фармацевтичні композиції

Антитіла до PD-1, описані в даному документі, можуть перебувати у формі композицій, що містять антитіло та один або декілька носіїв, наповнювачів та/або розріджувачів. Композиції можуть бути складені для конкретних шляхів застосування, як, наприклад, для шляхів застосування у ветеринарії або для фармацевтичних шляхів застосування у людини. Форма композиції (наприклад, сухий порошок, рідкий склад тощо) та наповнювачі, розріджувачі та/або носії будуть залежати від передбачуваних шляхів застосування антитіла та, у випадку терапевтичних шляхів застосування, способу введення.

У випадку терапевтичних шляхів застосування композиції можуть забезпечуватися як частина стерильної фармацевтичної композиції, яка містить фармацевтично прийнятний носій. Така композиція може мати будь-яку придатну форму (залежно від необхідного способу її введення пацієнту). Фармацевтичну композицію можна вводити пацієнту різними шляхами, як наприклад, перорально, трансдермально, підшкірно, інтраназально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, у пухлину, інтратекально, місцево або локально. Найбільш придатний спосіб уведення в будь-якому конкретному випадку буде залежати від конкретного антитіла, суб'єкта, природи й тяжкості захворювання та фізичного стану суб'єкта. Фармацевтичну композицію, як правило, вводять внутрішньовенно або підшкірно.

Для зручності фармацевтичні композиції можуть бути представлені у вигляді одиничних лікарських форм, що містять заздалегідь визначену кількість антитіла до PD-1, описаного в даному документі, на дозу. Кількість антитіла до PD-1, включеного в одиничну дозу, буде залежати від захворювання, що підлягає лікуванню, а також від інших факторів, добре відомих

із рівня техніки. Такі одиничні дози можуть перебувати у формі ліофілізованого сухого порошку, що містить кількість антитіла, яка є придатною для одного введення, або у формі рідини. Одиничні лікарські форми у вигляді сухого порошку можуть бути упаковані в набір, що містить шприц, відповідну кількість розріджувача та/або інші компоненти, які застосовуються для введення. Для зручності одиничні дози в рідкій формі можуть забезпечуватися у формі шприца, попередньо заповненого кількістю антитіла до PD-1, яка є придатною для одного введення.

Фармацевтичні композиції також можуть забезпечуватися в нерозфасованій формі, що містить кількості антитіла до PD-1, які є придатними для багаторазових уведень.

Фармацевтичні композиції можуть бути приготовані для зберігання у вигляді ліофілізованих складів або водних розчинів шляхом змішування антитіла, що має необхідний ступінь чистоти, із необов'язковими фармацевтично прийнятними носіями, наповнювачами або стабілізаторами, використовуваними, як правило, у даній галузі техніки (усі з яких у даному документі називаються "носії"), тобто буферними засобами, стабілізувальними засобами, консервантами, ізотонуючими добавками, неіоногенними детергентами, антиоксидантами та різними іншими добавками. Див. Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition (Osol, ed. 1980). Такі добавки мають бути нетоксичними для пацієнтів, що одержують їх, у використовуваних дозах і концентраціях.

Буферні засоби допомагають підтримувати pH у діапазоні, близькому до фізіологічних умов. Вони можуть бути присутні в різних концентраціях, але, як правило, вони будуть наявні в концентраціях від приблизно 2 мМ до приблизно 50 мМ. Придатні буферні засоби для застосування за даним винаходом передбачають як органічні, так і неорганічні кислоти та їхні солі, як, наприклад, цитратні буфери (наприклад, суміш цитрату мононатрію та цитрату динатрію, суміш лимонної кислоти та цитрату тринатрію, суміш лимонної кислоти та цитрату мононатрію тощо), сукцинатні буфери (наприклад, суміш бурштинової кислоти та сукцинату мононатрію, суміш бурштинової кислоти та гідроксиду натрію, суміш бурштинової кислоти та сукцинату динатрію тощо), тартратні буфери (наприклад, суміш винної кислоти та тартрату натрію, суміш винної кислоти та тартрату калію, суміш винної кислоти та гідроксиду натрію тощо), фосфатні буфери (наприклад, суміш фосфорної кислоти та фосфату мононатрію, суміш фосфорної кислоти та фосфату динатрію, суміш фосфату мононатрію та фосфату динатрію тощо), глюконатні буфери (наприклад, суміш глюконової кислоти та глюконату натрію, суміш глюконової кислоти та гідроксиду натрію, суміш глюконової кислоти та глюконату калію тощо), оксалатний буфер (наприклад, суміш щавлевої кислоти та оксалату натрію, суміш щавлевої кислоти та гідроксиду натрію, суміш щавлевої кислоти та оксалату калію тощо), лактатні буфери (наприклад, суміш молочної кислоти та лактату натрію, суміш молочної кислоти та гідроксиду натрію, суміш молочної кислоти та лактату калію тощо) й ацетатні буфери (наприклад, суміш оцтової кислоти та ацетату натрію, суміш оцтової кислоти та гідроксиду натрію тощо). Крім того, можна використовувати фумаратні буфери, гістидинові буфери та солі триметиламіну, такі як 2-аміно-2-гідроксилметилпропан-1,3-діол (тобто Tris, THAM або трис(гідроксиметил)амінометан).

Для забезпечення ізотонічності рідких композицій за даним винаходом можна додати ізотонуючі добавки, іноді відомі як "стабілізатори", та вони включають багатоатомні цукрові спирти, наприклад трьохатомні або вищі цукрові спирти, такі як гліцерин, еритрит, арабіт, ксиліт, сорбіт і маніт. До стабілізаторів належить широка категорії наповнювачів, які можуть виконувати функцію від об'ємоутворювального засобу до добавки, яка солюбілізує терапевтичний засіб або допомагає запобігти денатурації або прилипанню до стінки контейнера. Типові стабілізатори можуть являти собою багатоатомні цукрові спирти (перераховані вище); амінокислоти, такі як аргінін, лізин, гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аланін, орнітин, лейцин, 2-фенілаланін, глутамінова кислота, треонін тощо, органічні цукри або цукрові спирти, такі як лактоза, трегалоза, стахіоза, маніт, сорбіт, ксиліт, рибіт, міоінозит, галактит, гліцерин тощо, включаючи цикліти, такі як інозит; поліетиленгліколь; полімери амінокислот; сірковмісні відновлювальні засоби, такі як сечовина, глутатіон, тіоктова кислота, тіогліколят натрію, тіогліцерин, α-монотіогліцерин і тіосульфат натрію; низькомолекулярні поліпептиди (наприклад, пептиди з 10 залишками або менше); гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; моносахариди, такі як ксилоза, маноза, фруктоза, глюкоза; дисахариди, такі як лактоза, мальтоза, сахароза та трегалоза; та трисахариди, такі як рафіноза; та полісахариди, такі як декстран. Стабілізатори можуть бути присутні в кількостях, що варіюють від 0,5 до 10 мас. % у перерахунку на масу антитіла до PD-1.

Неіоногенні поверхнево-активні засоби або детергенти (також відомі як "змочувальні засоби") можна додавати для сприяння солюбілізації глікопротеїну, а також для захисту глікопротеїну від агрегації, що спричиняється перемішуванням, що також дозволяє складу піддаватися стресовій дії із зсувом поверхні без денатурації білка. Придатні неіоногенні

поверхнево-активні речовини включають полісорбати (20, 80 тощо), полоксамери (184, 188 тощо) та поліоли-плюроніки. Неіоногенні поверхнево-активні речовини можуть бути присутні в діапазоні кількості від приблизно 0,05 мг/мл до приблизно 1,0 мг/мл.

Конкретний ілюстративний варіант здійснення водної композиції, придатної для введення шляхом внутрішньовенної інфузії, передбачає 20 мг/мл антитіла до PD-1, яке містить послідовність важкого ланцюга під SEQ ID NO:51 або SEQ ID NO:52 та послідовність легкого ланцюга під SEQ ID NO:61, 15 мМ гістидинового буфера, pH 5,7, 8,0 % (вага/об'єм) сахарози та 0,05 % (вага/об'єм) полісорбату 80. Композиція може перебувати у формі ліофілізованого порошку, який після ресуспендування за допомогою стерильної води або іншого розчину, придатного для ін'єкції або інфузії (наприклад, 0,9 % сольового розчину, розчину Рінгера, розчину Рінгера з лактатом тощо), забезпечує одержання вищевказаної водної композиції. Композиція або інші варіанти здійснення композицій також можуть перебувати у формі шприца або іншого пристрою, придатного для ін'єкції та/або інфузії, попередньо заповненого кількістю композиції, придатною для однократного введення антитіла до PD-1.

7.6. Способи застосування

7.6.1. Терапевтичний ефект

Дані, представлені у даному документі, демонструють, що розкриті антитіла до PD-1 спричиняють антагоністичний вплив на PD-1 у присутності ракових клітин та володіють сильною in vivo протираковою активністю щодо таких видів раку, як солідні пухлини та злоякісні захворювання крові. Відповідно, антитіла до PD-1, зв'язувальні фрагменти та/або фармацевтичні композиції, які містять антитіла до PD-1, можна застосовувати терапевтично для лікування солідних пухлин або злоякісних захворювань крові.

У деяких варіантах здійснення спосіб передбачає введення пацієнту-людині, що має солідну пухлину, певної кількості антитіла до PD-1, що спричиняє антагоністичний вплив на PD-1 та знищує пухлинні клітини на рівні, ефективному для забезпечення терапевтичного ефекту. Солідні пухлини, які можна лікувати за допомогою антитіла до PD-1, включають без обмежень види раку наднирників, види раку сечового міхура, види раку кісток, види раку головного мозку, види раку молочної залози (наприклад, тричі негативний рак молочної залози), види раку шийки матки, види колоректального раку, види раку ендометрію, види раку стравоходу, види раку ока, види раку шлунку, види раку голови та шиї, види раку нирки (наприклад, задавнену нирково-клітинну карциному), види раку печінки (наприклад, гепатоцелюлярну карциному, холангіокарциному), види раку легені (наприклад, недрібноклітинний рак легені, мезотеліому, дрібноклітинний рак легені), види раку голови та шиї, види меланоми (наприклад, неоперабельну або метастатичну меланому, задавнену злоякісну меланому), види раку ротової порожнини, види раку яєчника, види раку статевого члена, види раку простати, види раку підшлункової залози, види раку шкіри (наприклад, карциному з клітин Меркеля), види раку яєчка, види раку щитоподібної залози, види раку матки, види раку піхви та пухлини з доведеною недостатністю репарації помилково спарених основ ДНК. Ракові пухлини можуть складатися з пухлинних клітин, які експресують PD-L1 або PD-L2, ракові пухлини складаються з пухлинних клітин, які не експресують PD-L1 або PD-L2, або ракові пухлини складаються з пухлинних клітин, деякі з яких експресують PD-L1 або PD-L2, а деякі з яких не експресують. Рак може являти собою форму солідної пухлини, яка вперше діагностована та раніше не піддавалася лікуванню, або може являти собою рецидивну, рефрактерну, або рецидивну та рефрактерну, або метастатичну форму. У деяких варіантах здійснення солідна пухлина вибрана з раку сечового міхура, раку молочної залози, раку голови та шиї, раку нирки, раку легені, лімфоми, меланоми та раку шлунку. У деяких варіантах здійснення солідна пухлина вибрана з меланоми (наприклад, неоперабельної або метастатичної меланоми), раку легені (наприклад, не дрібноклітинного раку легені) та нирково-клітинної карциноми (наприклад, задавненої нирково-клітинної карциноми). У деяких варіантах здійснення солідна пухлина вибрана з тричі негативного раку молочної залози, раку яєчника, гепатоцелюлярної карциноми, раку шлунку, дрібноклітинного раку легені, мезотеліоми, холангіокарциноми, карциноми з клітин Меркеля та пухлин з доведеною недостатністю репарації помилково спарених основ ДНК. У певних варіантах здійснення меланома являє собою неоперабельну або метастатичну меланому BRAF V600 дикого типу. У інших певних варіантах здійснення меланома являє собою неоперабельну або метастатичну меланому BRAF V600 з мутаціями. У певних варіантах здійснення рак легені являє собою метастатичний не дрібноклітинний рак легені з поточним прогресуванням або після хіміотерапії на основі платини. У певних варіантах здійснення рак легені являє собою локально задавнений або метастатичний не дрібноклітинний рак легені, який не піддався лікуванню терапевтичним засобом на основі платини та не зазнавав впливу засобу, який націлюється на PD-1. У певних варіантах здійснення рак голови та шиї являє собою

метастатичну (дисеміновану) плоскоклітинну карциному голови та шиї, локалізовану в ротовій порожнині, ротовій частині глотки, гортанній частині глотки та гортані, яка вважається некурабельною за допомогою засобів місцевої терапії. У певних варіантах здійснення нирково-клітинна карцинома являє собою задавнену нирково-клітинну карциному, яку раніше лікували за допомогою антиангіогенного терапевтичного засобу.

У деяких варіантах здійснення спосіб за даним винаходом включає введення пацієнту-людині, що має злоякісне захворювання крові, певної кількості антитіла до PD-1, що спричиняє антагоністичний вплив на PD-1 та знищує злоякісні клітини на рівні, ефективному для забезпечення терапевтичного ефекту. Ракові пухлини можуть складатися зі злоякісних клітин, які експресують PD-L1 або PD-L2, ракові пухлини складаються зі злоякісних клітин, які не експресують PD-L1 або PD-L2, або ракові пухлини складаються зі злоякісних клітин, деякі з яких експресують PD-L1 або PD-L2, а деякі з яких не експресують. Рак може являти собою вперше діагностовану форму злоякісного захворювання крові, яке раніше не зазнавало лікування, або може являти собою рецидивну, рефрактерну, або рецидивну та рефрактерну, або метастатичну форму. Злоякісні пухлини на основі гемопоетичних клітин, які можна лікувати за допомогою антитіла до PD-1, включають без обмеження види мієломи (наприклад, множинну мієлому), види лімфоми (наприклад, ходжкінську лімфому, неходжкінську лімфому, макроглобулінемію Вальденстрема, лімфому з клітин мантійної зони), види лейкозу (наприклад, хронічний лімфоцитарний лейкоз, гострий мієлоїдний лейкоз, гострий лімфоцитарний лейкоз) та мієлодиспластичні синдроми.

Як обговорюється вище, розкриті у даному винаході антитіла до PD-1 модулюють імунну відповідь. Відповідно, пацієнти, які мають ослаблену імунну систему, можуть бути виключені з лікування. У деяких варіантах здійснення пацієнта виключають після задоволення одного або декількох з наступних критеріїв: (1) активне або раніше документально зафіксоване аутоімунне захворювання (включаючи без обмеження запальне захворювання кишечнику, целіакію, синдром Вегенера) протягом періоду останніх 2 років (не виключають суб'єктів із дитячою атопією або астмою, вітиліго, алопецією, синдромом Хашимото, хворобою Грейвса або псоріазом, які не потребують системного лікування (протягом періоду останніх 2 років)); (2) первинний імунодефіцит, трансплантація кісткового мозку, хронічний лімфоцитарний лейкоз, трансплантація паренхіматозних органів в анамнезі або попередньо клінічно діагностований туберкульоз; (3) коагулопатія або тромбоцитарне порушення в анамнезі; (4) підтверджені позитивні результати тесту на вірус імунодефіциту людини (HIV) або хронічний або активний гепатит B або C у суб'єктів (у лікування можуть бути включені суб'єкти з гепатитом B або C в анамнезі, одужання яких після одержання противірусної терапії було документально зафіксовано); (5) попередні випадки імуноопосередкованої нейротоксичності або пневмонії $\geq$3 ступеня під час одержання імунотерапії (у тому числі без обмеження засобів, спрямованих проти CTLA-4, PD-L1 або PD-1). Окрім того, будь-які інші попередні випадки імуноопосередкованого небажаного явища $\geq$3 ступеня під час одержання імунотерапії, яке не було усунуто або не стало безсимптомним протягом 3 місяців; (6) одержання живої атенуйованої вакцини протягом періоду 28 днів до прийому першої дози антитіла до PD-1.

Антитіло до PD-1 за даним винаходом можна вводити окремо (монотерапія) або додатково до інших протиракових видів терапії та/або протиракових засобів, що здійснюють або не здійснюють цілеспрямований вплив, або спільно з ними. У разі введення антитіла до PD-1 як монотерапії, можна застосовувати одне або декілька антитіл. Незалежно від того, чи вводять антитіло до PD-1 як монотерапію або додатково або спільно з іншими видами терапії або засобами, його кількість уводять таким чином, що загальна схема лікування забезпечує терапевтичний ефект.

Під терапевтичним ефектом розуміють, що застосування антитіл до PD-1 для лікування раку в пацієнта спричиняє будь-який продемонстрований клінічний результат порівняно з відсутністю терапії (у відповідних випадках) або з відомим стандартом лікування. Клінічний результат можна оцінити за допомогою будь-якого способу, відомого пересічному фахівцю в даній галузі. В одному варіанті здійснення клінічний результат оцінюють на основі частоти об'єктивних відповідей (ORR) (що визначається за допомогою RECIST версії 1.1), тривалості відповіді (DOR), виживаності без прогресування (PFS) та/або загальної виживаності (OS). У деяких варіантах здійснення ознакою терапевтичного ефекту є повна відповідь. У деяких варіантах здійснення ознакою терапевтичного ефекту є часткова відповідь. У деяких варіантах здійснення ознакою терапевтичного ефекту є стабілізація захворювання. У деяких варіантах здійснення ознакою терапевтичного ефекту є збільшення загальної виживаності. У деяких варіантах здійснення терапевтичний ефект може являти собою збільшення часу до прогресування захворювання та/або зменшення симптомів або поліпшення якості життя. В інших варіантах

здійснення терапевтичний ефект може не поширюватися на збільшення періоду контролю захворювання, а радше помітно знижувати тяжкість симптомів, що веде до збільшення якості життя. Як буде очевидно фахівцям у даній галузі, терапевтичний ефект може спостерігатися під час застосування антитіл до PD-1 окремо (монотерапія) або додатково або спільно з іншими видами протиракової терапії та/або протиракovими засобами, що здійснюють або не здійснюють цілеспрямований вплив.

Як правило, терапевтичний ефект оцінюють із застосуванням стандартних клінічних тестів, розроблених для вимірювання відповіді на новий засіб для лікування раку. Для оцінки терапевтичного ефекту антитіл до PD-1, описаних у даному документі, можна застосовувати один із наступних тестів або комбінацію: (1) критерії оцінки відповіді солідних пухлин (RECIST) версії 1.1, (2) імунозалежні RECIST (irRECIST), (3) загальний стан згідно зі Східною об'єднаною онкологічною групою (ECOG), (4) імунозалежні критерії відповіді (irRC), (5) оцінка захворювання за допомогою оцінки пухлинних антигенів, (6) валідовані шкали оцінок результатів, що повідомляються пацієнтами, та/або (7) оцінки Каплана-Меєра для загальної виживаності та виживаності без прогресування.

Оцінка зміни пухлинного навантаження є важливою особливістю клінічної оцінки засобів для терапії раку. Як зменшення розмірів пухлини (об'єктивна відповідь), так і час до розвитку прогресування захворювання є важливими кінцевими точками у клінічних випробуваннях щодо раку. Стандартизовані критерії відповіді, відомі як RECIST (критерії оцінки відповіді солідних пухлин), були опубліковані у 2000 році. Оновлена версія (RECIST 1.1) була випущена у 2009 році. Критерії RECIST, як правило, використовують у клінічних випробуваннях, в яких первинною кінцевою точкою дослідження є об'єктивна відповідь, а також у тих випробуваннях, в яких проводять оцінку стабілізації захворювання, прогресування пухлини або часу до прогресування, оскільки такі показники результату базуються на оцінці анатомічного пухлинного навантаження та його зміни під час випробування. У таблиці 4 представлені визначення критеріїв відповіді, використовуваних для визначення об'єктивної відповіді пухлини на досліджуваний лікарський засіб, такий як антитіла до PD-1, описані в даному документі.

Таблиця 4

Відповідь	Критерії
Повна відповідь (CR)	Зникнення всіх цільових осередків ураження. Розмір усіх патологічних лімфатичних вузлів (як цільових, так і нецільових) повинен зменшитися за короткою віссю до <10 мм.
Часткова відповідь (PR)	Зменшення суми діаметрів цільових осередків ураження на щонайменше 30 %, при цьому еталонною вважається вихідна сума діаметрів.
Прогресування захворювання (PD)	Збільшення суми діаметрів цільових осередків ураження на щонайменше 20 %, при цьому еталонною вважається найменша сума за період дослідження (вона включає вихідну суму, якщо така є найменшою за період дослідження). На додачу до відносного збільшення на 20 %, абсолютне збільшення суми також має становити щонайменше 5 мм. (Примітка: поява одного або декількох нових осередків ураження також вважається прогресуванням).
Стабілізація захворювання (SD)	Не спостерігається ані достатнє зменшення розмірів пухлини, щоб відповідати критеріям PR, ані достатнє збільшення, щоб відповідати критеріям PD, при цьому еталонною вважається найменша сума діаметрів під час дослідження.

Вторинні показники результату, які можна застосовувати для визначення терапевтичного ефекту антитіл до PD-1, описаних у даному документі, передбачають частоту об'єктивної відповіді (ORR), виживаність без прогресування (PFS), загальну виживаність (OS), тривалість загальної відповіді (DOR) та глибину відповіді (DpR). ORR визначають як частку учасників, у яких була досягнута повна відповідь (CR) або часткова відповідь (PR). PFS визначають як час від дати введення першої дози антитіла до PD-1 до прогресування захворювання або смерті, залежно від того, що відбудеться раніше. OS визначають як період часу або від дати постановки діагнозу, або від початку лікування захворювання, протягом якого пацієнти з діагностованим захворюванням залишаються живими. DOR визначають як час від початкової CR або PR учасника до періоду прогресування захворювання. DpR визначають як відсоткове значення зменшення розмірів пухлини, що спостерігається в момент максимальної відповіді,

порівняно з вихідним пухлинним навантаженням. Клінічні кінцеві точки як для ORR, так і для PFS можна визначити на основі критеріїв RECIST 1.1, описаних вище.

Додаткові критерії, які можна використовувати для клінічного оцінювання, призначеного спеціально для пацієнтів з раком, яких піддають імунотерапевтичному лікуванню, включають стандартизовані імунозалежні критерії RECIST (irRECIST). Див., наприклад, Nishino, M. et al. Eur. J. Radiol., 84(7), сторінки 1259-1268 (липень 2015 року). У цих посібниках вищезазначені критерії RECIST 1.1 модифіковані з урахуванням можливих імуномодулювальних ефектів. У таблиці 5 наведені визначення критеріїв відповіді, застосовуваних для визначення об'єктивної відповіді пухлини на імуномодулювальний лікарський засіб, такий як антитіла до PD-1, описані у даному документі.

Таблиця 5

Відповідь	Критерії
Повна відповідь (irCR)	Повне зникнення всіх вимірюваних і невимірюваних осередків ураження. Розмір лімфатичних вузлів має зменшитися до < 10 мм за короткою віссю.
Часткова відповідь (irPR)	Зменшення загального виміряного пухлинного навантаження на ≥30 % щодо вихідного рівня, нецільові осередки ураження відповідають критеріям irNN, і не спостерігається явне прогресування нових невимірюваних осередків ураження.
Прогресування захворювання (irPD)	Збільшення на щонайменше 20 % та абсолютне збільшення на щонайменше 5 мм для TMTB порівняно з найнижчим рівнем або irPD для нецільових або нових не вимірюваних осередків ураження. Підтвердження прогресування рекомендується проводити щонайменше через 4 тижні після першої оцінки, що відповідає критеріям irPD.
Невідповідність критеріям irCR або невідповідність критеріям irPD (irNN)	На вихідному рівні не було ідентифіковане цільове захворювання, і під час подальшого спостереження пацієнт не відповідає критеріям irCR або irPD
Стабілізація захворювання (irSD)	Не спостерігається ані достатнє зменшення розмірів пухлини, щоб відповідати критеріям irPR, ані достатнє збільшення, щоб відповідати критеріям irPD, при цьому еталонною вважається найменша сума діаметрів під час дослідження.
irNE	Використовується у виняткових випадках за недостатньої кількості даних.

Шкалу загального стану згідно з ECOG, показану в таблиці 6, використовують для опису рівня функціонування пацієнта з погляду його здатності піклуватися про себе, повсякденної активності та фізичних можливостей. Шкала була розроблена Східною об'єднаною онкологічною групою (ECOG), яка на сьогодні є частиною Онкологічної дослідної групи ECOG-ACRIN, та опублікована в 1982 році.

Таблиця 6

Ступінь	Загальний стан згідно з ECOG
0	Повністю активний, здатний без обмежень виконувати всю ту саму діяльність, що й до захворювання
1	Обмежений у фізично напруженій діяльності, але здатний ходити та здатний виконувати роботу легкого або сидячого характеру, наприклад, легку роботу вдома, роботу в офісі
2	Здатний ходити та здатний до повноцінного самообслуговування, але не здатний виконувати жодну роботу; перебуває на ногах протягом більш ніж 50 % годин неспання
3	Здатний тільки до обмеженого самообслуговування; прикутий до ліжка або візка протягом більш ніж 50 % годин неспання
4	Повністю непрацездатний; нездатний до самообслуговування; повністю прикутий до ліжка або візка
5	Смерть

Ще один набір критеріїв, який можна застосовувати, щоб повністю охарактеризувати та визначити відповідь на імунотерапевтичні засоби, такі як засоби протиракової терапії на основі

антитіл, являє собою імунозалежні критерії відповіді (irRC), які були розроблені для вимірювання солідних пухлин у 2009 році та оновлені у 2013 році (Wolchok, et al. Clin. Cancer Res. 2009; 15(23): 7412-7420 та Nishino, et al. Clin. Cancer Res. 2013; 19(14): 3936-3943). Оновлені критерії irRC, як правило, використовують для оцінки ефекту імунотерапевтичного засобу, такого як антитіло до PD-1, описане в даному документі, на пухлинне навантаження та відповідь визначають згідно з таблицею 7.

Таблиця 7

Відповідь	Критерії
Повна відповідь (CR)	Зникнення всіх цільових осередків послідовних обстежень з інтервалом, ураження упродовж двох не меншим ніж 4 тижні
Часткова відповідь (PR)	Зменшення ураження вважається суми найбільших діаметрів цільових осередків на щонайменше 30 %, при цьому еталонною вихідна сума діаметрів
Прогресування захворювання (PD)	Збільшення суми діаметрів цільових осередків ураження на щонайменше 20 %, при цьому еталонною вважається найменша сума за період дослідження (вона включає вихідну суму, якщо така є найменшою за період дослідження). (Примітка: поява одного або декількох нових осередків ураження не вважається прогресуванням. Результати вимірювання нових осередків ураження включають у суму результатів вимірювань).
Стабілізація захворювання (SD)	Не спостерігається ані достатнє зменшення розмірів пухлини, щоб відповідати критеріям PR, ані достатнє збільшення, щоб відповідати критеріям PD, при цьому еталонною вважається найменша сума діаметрів під час дослідження.

Пухлинні антигени, які можна застосовувати для оцінки терапевтичного ефекту антитіл до PD-1, описаних у даному документі, включають ApoE, CD11c, CD40, CD45 (PTPRC), CD49D (ITGA4), CD80, CSF1R, CTSD, GZMB, Ly86, MS4A7, PIK3AP1, PIK3CD, CD74, CCL5. CCR5, CXCL10, IFNG, IL10RA1, IL-6, ACTA2, COL7A1, LOX, LRRC15, MCPT8, MMP10, NOG, SERPINE1, STAT1, TGFBR1, CTSS, PGF, VEGFA, C1QA, C1QB, ANGPTL4, EGLN, ANGPTL4, EGLN3, BNIP3, AIF1, CCL5, CXCL10, CXCL11, IFI6, PLOD2, KISS1R, STC2, DDIT4, OX40, OX40L, PFKFB3, PGK1, PDK1, AKR1C1, AKR1C2, CADM1, CDH11, COL6A3, CTGF, HMOX1, KRT33A, LUM, WNT5A, IGFBP3, MMP14, CDCP1, PDGFRA, TCF4, TGF, TGFB1, TGFB2, CD11b, ADGRE1 (EMR1, F4/80), CD86, CD68, MHC-класу II, CD3, HLA-DR, CD4, CD3, CD5, CD19, CD7, CD8, CD 16, TCR$\alpha\beta$, TCR$\gamma\delta$, PD-1, PD-L1, CTLA-4, кислу фосфатазу, ACTH, лужну фосфатазу, альфа-фетопротеїн CA-125, CA15-3, CA19-9, CA-195, C-212, CA-549, кальцитонін, катехоламіни, катепсин-D, CEA, ERBB2 (HER2/neu), хромогранін-A, c-Myc, EGFR, ERA (аналіз естрогенових рецепторів), феритин, гастрин, 5-HIAA, hCG, альфа-HCG, бета-HCG, HVA, LDH1-5, NSE (нейрон-специфічна енолаза), панкреатичний поліпептид, PLAP, PLP, PRA (прогестероновий рецептор A), C-пептид проінсуліну, PSA, SMA, SCC, тиреоглобулін, TDT, TPA та альфа-TSH. Дані пухлинні антигени можна оцінювати на рівні ДНК, РНК або білка із застосуванням методик секвенування ДНК, методик секвенування РНК, мікроматричного аналізу на генному чипі, способів на основі ПЛР, способів проточної цитометрії або імуногістохімії, які відомі фахівцям у даній галузі.

Одним ілюстративним терапевтичним ефектом, що виникає внаслідок застосування антитіл до PD-1, описаних у даному документі, для лікування солідних пухлин, незалежно від того, чи вводять їх як монотерапію або додатково або спільно з іншими видами терапії або засобами, є повна відповідь. Іншим ілюстративним терапевтичним ефектом, що виникає внаслідок застосування антитіл до PD-1, описаних у даному документі, для лікування солідних пухлин, незалежно від того, чи вводять їх як монотерапію або додатково або спільно з іншими видами терапії або засобами, є часткова відповідь.

Для позначення відповіді, що надається кожним пацієнтом через визначену систему надання інформації, також можна застосовувати валідовані шкали результатів, які повідомляються пацієнтами. Такі шкали результатів не фокусуються на захворюванні, а радше стосуються збереження функціонування під час підтримування хронічного стану. Одним не обмежувальним прикладом валідованої шкали результатів, що повідомляються пацієнтами, є PROMIS® (Інформаційна система для вимірювання результатів, що повідомляються пацієнтами) від Національних інститутів охорони здоров'я Сполучених Штатів Америки.

Наприклад, за допомогою інструмента для оцінки функціонального статусу PROMIS® для дорослих пацієнтів із раком можна оцінювати можливості, що повідомляються самими пацієнтами, стосовно функціонування верхніх кінцівок (наприклад, вправність), нижніх кінцівок (наприклад, ходіння або рухливість) та центральних частин тіла (наприклад, рухливість шиї та спини) і в тому числі звичайні форми повсякденної активності, такі як виконання доручень.

Криві Каплана-Меєра (Kaplan and Meier, J. Am. Stat. Assoc. 1958; 53(282): 457-481) також можна використовувати для оцінки загальної виживаності та виживаності без прогресування у пацієнтів із раком, що проходять терапію антитілом до PD-1, порівняно зі стандартом лікування.

7.6.2. Види додаткової терапії

Антитіла до PD-1 можна використовувати додатково або спільно з іншими засобами або видами лікування, що характеризуються протираковими властивостями. У разі застосування як додаткової терапії антитіло до PD-1 та інший(інші) засіб(засоби) можуть бути складені разом в одному комбінованому фармацевтичному складі або можуть бути складені та вводитися окремо або у вигляді однієї координованої схеми введення доз, або у вигляді різних схем введення доз. Засоби, що вводяться додатково або спільно з антитілами до PD-1, як правило, будуть характеризуватися взаємодоповнювальними видами активності для антитіл до PD-1, унаслідок чого антитіла та інші засоби не будуть чинити несприятливий вплив одне на одного.

Засоби, які можна застосовувати як додаткову терапію з антитілами до PD-1, включають без обмеження алкілувальні засоби, інгібітори ангіогенезу, антитіла, антиметаболіти, антимітотичні засоби, антипроліферативні засоби, противірусні засоби, інгібітори аврора-кінази, фактори, які сприяють апоптозу (наприклад, інгібітори родини Bc1-2), активатори шляху рецепторів смерті, інгібітори Bcr-Ab1 кінази, антитіла BiTE (біспецифічні активатори, які залучають Т-клітини), кон'югати антитіл та лікарських засобів, модифікатори біологічних відповідей, інгібітори тирозинкінази Брутона (BTK), інгібітори циклін-залежних кіназ, інгібітори клітинного циклу, інгібітори циклооксигенази-2, DVD, інгібітори рецепторів гомолога вірусного онкогену лейкозу (ErbB2), інгібітори факторів росту, інгібітори білка теплового шоку (HSP)-90, інгібітори гістондеацетилази (HDAC), засоби гормональної терапії, імунологічні препарати, інгібітори інгібіторів білків апоптозу (IAP), інтеркалювальні антибіотики, інгібітори кіназ, інгібітори кінезинів, інгібітори Jak2, інгібітори мішені рапаміцину в ссавців, мікроРНК, інгібітори мітоген-активованих кіназ, які регулюються позаклітинними сигналами, мультивалентні зв'язувальні білки, нестероїдні протизапальні лікарські засоби (NSAID), інгібітори полі-АДФ (аденозиндифосфат)-рибозо-полімерази (PARP), хіміотерапевтичні препарати на основі платини, інгібітори Polo-подібних кіназ (Plk), інгібітори фосфоінозитид-3-кінази (PI3K), інгібітори протеасом, аналоги пуринів, аналоги піримідинів, інгібітори рецепторних тирозинкіназ, ретиноїди/дельтоїди, рослинні алкалоїди, малі інгібувальні рибонуклеїнові кислоти (siRNA), інгібітори топоізомераз, інгібітори убіквітинлігази тощо, а також комбінації одного або декількох з цих засобів.

Антитіла BiTE являють собою біспецифічні антитіла, які примушують Т-клітини атакувати ракові клітини шляхом одночасного зв'язування з цими двома клітинами. Згодом Т-клітина атакує цільову ракову клітину. Приклади антитіл BiTE включають адекатумумаб (Micromet MT201), блінатумомаб (Micromet MT103) тощо. Не обмежуючись теорією, одним з механізмів, за допомогою яких Т-клітини запускають апоптоз у цільової ракової клітини, являє собою екзоцитоз компонентів цитолітичної гранули, які включають перфорин та гранзим B.

SiRNA являють собою молекули, які містять ендогенні РНК-основи або хімічно модифіковані нуклеотиди. Модифікації не призводять до припинення функціонування у клітині, а радше надають їм стійкість та/або підвищену активність у клітині. Приклади хімічних модифікацій включають фосфоротіоатні групи, 2'-дезоксинуклеотид, рибонуклеотиди, які містять 2'-OCH_3, 2'-F-рибонуклеотиди, 2'-метоксиетил-рибонуклеотиди; їх комбінації тощо. siRNA можуть мати різну довжину (наприклад, 10-200 пар основ) і різні структури (наприклад, шпильки, одиночні/подвійні нитки, петлі, однониткові розриви/двониткові розриви, помилкове спарювання основ) та піддаються процесингу в клітинах із забезпеченням сайленсингу активних генів. Двониткова siRNA (dsRNA) може мати однакову кількість нуклеотидів на кожній нитці (тупі кінці) або характеризуватися асиметричними (липкими) кінцями. Виступ із 1-2 нуклеотидів може бути присутнім на сенсовій і/або антисенсовій нитці, а також присутнім на 5'- і/або 3'-кінцях даної нитки.

Мультивалентні зв'язувальні білки являють собою зв'язувальні білки, які передбачають два або більше антигензв'язувальних центрів. Мультивалентні зв'язувальні білки сконструйовані так, що вони містять три або більше антигензв'язувальних центрів і зазвичай не є природними антитілами. Термін "мультиспецифічний зв'язувальний білок" означає зв'язувальний білок, здатний зв'язувати дві або більше споріднених або неспоріднених мішеней. Зв'язувальні білки з подвійним варіабельним доменом (DVD) являють собою тетравалентні або мультивалентні

зв'язувальні білки, які включають два або більше антигензв'язувальних центрів. Такі DVD можуть бути моноспецифічними (тобто здатними зв'язувати один антиген) або мультиспецифічними (тобто здатними зв'язувати два або більше антигенів). DVD- зв'язувальні білки, що містять два DVD-поліпептиди важкого ланцюга і два DVD-поліпептиди легкого ланцюга, позначаються як DVD-Ig. Кожна половина DVD-Ig містить DVD-поліпептид важкого ланцюга, DVD-поліпептид легкого ланцюга і два антигензв'язувальні центри. Кожний зв'язувальний центр містить варіабельний домен важкого ланцюга та варіабельний домен легкого ланцюга, які містять загалом 6 CDR, залучених у зв'язування антигена, на антигензв'язувальний центр.

Алкілувальні засоби включають без обмеження алтретамін, AMD-473, AP-5280, апазиквон, бендамустин, бросталіцин, бусульфан, карбоквон, кармустин (BCNU), хлорамбуцил, CLORETAZINE® (ларомустин, VNP 40101M), циклофосфамід, дакарбазин, естрамустин, фотемустин, глюфосфамід, іфосфамід, KW-2170, ломустин (CCNU), мафосфамід, мелфалан, мітобронітол, мітолактол, німустин, N-оксид азотистого іприту, ранімустин, темозоломід, тіотепу, TREANDA (бендамустин), треосульфан та трофосфамід.

Інгібітори ангіогенезу включають без обмеження інгібітори ендотелій-специфічної рецепторної тирозинкінази (Tie-2), інгібітори рецепторів епідермального фактору росту (EGFR), інгібітори рецепторів фактору росту ендотелію судин (VEGF), інгібітори дельта-подібного ліганда 4 (DLL4), інгібітори рецепторів інсуліноподібного фактору росту-2 (IGFR-2), інгібітори матриксної металопротеїнази-2 (MMP-2), інгібітори матриксної металопротеїнази-9 (MMP-9), інгібітори рецепторів тромбоцитарного фактору росту (PDGFR), аналоги тромбоспондину та інгібітори рецепторної тирозинкінази фактору росту ендотелію судин (VEGFR).

Кон'югати антитіл та лікарських засобів включають без обмеження такі, які націлені на кіназу c-Met (наприклад, ADC, описані у патенті США № 7615529), LRRC15, CD30 (наприклад, ADCETRIS® (брентуксимаб ведотин)), CS1 (наприклад, ADC, описані у публікації заявки на патент США № 20160122430), DLL3 (наприклад, ровалпітузумаб тезирин (ROVA-T)), HER2 (наприклад, KADCYLA® (трастузумаб емтанзин)), EGFR (наприклад, ADC, описані у публікації заявки на патент США № 20150337042) та пролактиновий рецептор (наприклад, ADC, описані у публікації заявки на патент США № 20140227294).

Антиметаболіти включають без обмеження ALIMTA® (пеметрексед динатрію, LY231514, MTA), 5-азацитидин, XELODA® (капецитабін), кармофур, LEUSTAT® (кладрибін), клофарабін, цитарабін, цитарабіну окфосфат, цитозин-арабінозид, децитабін, дефероксамін, доксифлуридин, ефлорнітин, EICAR (5-етиніл-1-β-D-рибофуранозилімідазол-4-карбоксамід), еноцитабін, етнілцитидин, флударабін, 5-фторурацил окремо або в комбінації з лейковорином, GEMZAR® (гемцитабін), гідроксисечовину. ALKERAN® (мелфалан), меркаптопурин. 6-меркаптопурину рибозид, метотрексат, мікофенолову кислоту, неларабін, нолатрексед, окфосфат, пелітрексол, пентостатин, ралтітрексед, рибавірин, триапін, триметрексат, S-1, тіазофурин, тегафур, TS-1, відарабін та UFT.

Противірусні препарати включають без обмеження ритонавір, ацикловір, цидофовір, ганцикловір, фоскарнет, зидовудин, рибавірин і гідроксихлорохін.

Інгібітори аврора-кіназ включають без обмеження ABT-348, AZD-1152, MLN-8054, VX-680, специфічні інгібітори аврора А-кінази, специфічні інгібітори аврора В-кінази та універсальні інгібітори аврора-кіназ.

Інгібітори білка Bcl-2 включають без обмеження ABT-263 (навітоклакс), AT-101 ((-)госипол), GENASENSE® (G3139 або облімерсен (антисенсовий олігонуклеотид, що націлюється на Bc1-2)), IPI-194, IPI-565, N-[-(4-(4-((4'-хлор(1,1'-біфеніл)-2-іл)метил)піперазин-1-іл)бензоїл)-4-(((1R)-3-(диметиламіне)-1-((фенілсульфаніл)метил)пропіл)аміно)-3-нітробензолсульфонамід), N-(4-(4-((2-(4-хлорфеніл)-5,5-диметил-1 -циклогекс-1-єн-1-іл)метил)піперазин-1-іл)бензоїл)-4-(((1R)-3-(морфолін-4-іл)-1- -((фенілсульфаніл)метил)пропіл)аміно)-3-((трифторметил)сульфоніл)бензолсульфонамід, венетоклакс і GX-070 (обатоклакс).

Інгібітори Bcr-Ab1 кінази включають без обмеження DASATINIB® (BMS-354825) і GLEEVEC® (іматиніб).

Інгібітори BTK включають без обмеження ібрутиніб та акалабрутиніб.

Інгібітори CDK включають без обмеження AZD-5438, BMI-1040, BMS-032, BMS-387, CVT-2584, флавопіридол, GPC-286199, MCS-5A, PD0332991, PHA-690509, селіцикліб (CYC-202, R-росковітин) і ZK-304709.

Інгібітори COX-2 включають без обмеження ABT-963, ARCOXIA® (еторикоксиб), BEXTRA® (валдекоксиб), BMS347070, CELEBREX® (целекоксиб), COX-189 (люміракоксиб), CT-3, DERAMAXX® (деракоксиб), JTE-522, 4-метил-2-(3,4-диметилфеніл)-1-(4-сульфамоїлфеніл-1H-

пірол), MK-663 (еторикоксиб), NS-398, парекоксиб, RS-57067, SC-58125, SD-8381, SVT-2016, S-2474, T-614 і VIOXX® (рофекоксиб).

Інгібітори EGFR включають без обмеження ABX-EGF, імуноліпосоми, спрямовані на EGFR, EGF-вакцину, EMD-7200, ERBITUX® (цетуксимаб), HR3, IgA-антитіла, IRESSA® (гефітиніб), TARCEVA® (ерлотиніб або OSI-774), TAGRISSO® (осимертиніб), TP-38, злитий білок з EGFR та TYKERB® (лапатиніб).

Інгібітори рецептора ErbB2 включають без обмеження CP-724-714, CI-1033 (канертиніб), HERCEPTIN® (трастузумаб), TYKERB® (лапатиніб), OMNITARG® (2C4, пертузумаб), TAK-165, GW-572016 (іонафарніб), GW-282974, EKB-569, PI-166, dHER2 (HER2-вакцина), APC-8024 (HER-2-вакцина), біспецифічне антитіло до HER/2neu, B7.her2IgG3, трифункціональні біспецифічні антитіла AS HER2, mAB AR-209 і mAB 2B-1.

Інгібітори гістондеацетилази включають без обмеження депсипептид, LAQ-824, MS-275, трапоксин, субероїланілід гідроксамової кислоти (SAHA), TSA та вальпроєву кислоту.

Інгібітори HSP-90 включають без обмеження 17-AAG-nab, 17-AAG, CNF-101, CNF-1010. CNF-2024, 17-DMAG, гелданаміцин, IPI-504, KOS-953, MYCOGRAB® (рекомбінантне людське антитіло до HSP-90), NCS-683664, PU24FC1, PU-3, радицикол, SNX-2112, STA-9090 та VER49009.

Інгібітори білків апоптозу включають без обмеження HGS1029, GDC-0145, GDC-0152, LCL-161 і LBW-242.

Активатори шляху рецепторів смерті включають без обмеження TRAIL, антитіла або інші засоби, які націлюються на TRAIL або рецептори смерті (наприклад, DR4 та DR5), такі як апомаб, конатумумаб, ETR2-ST01, GDC0145 (лексатумумаб), HGS-1029, LBY-135, PRO-1762 та трастузумаб.

Інгібітори кінезину включають без обмеження інгібітори Eg5, такі як AZD4877, ARRY-520; та інгібітори CENPE, такі як GSK923295A.

Інгібітори JAK-2 включають без обмеження CEP-701 (лезауртиніб), XL019 та INCB018424.

Інгібітори MEK включають без обмеження ARRY-142886, ARRY-438162, PD-325901 та PD-98059.

Інгібітори mTOR включають без обмеження AP-23573, CCI-779, еверолімус, RAD-001, рапаміцин, темсиролімус, АТФ-конкурентні інгібітори TORC1/TORC2, включаючи PI-103, PP242, PP30 та торин 1.

Нестероїдні протизапальні лікарські засоби включають без обмеження AMIGESIC® (салсалат), DOLOBID® (дифлунісал), MOTRIN® (ібупрофен), ORUDIS® (кетопрофєн), RELAFEN® (набуметон), FELDENE® (піроксикам), ібупрофен-крем, ALEVE® (напроксен) та NAPROSYN® (напроксен), VOLTAREN® (диклофенак), INDOCIN® (індометацин), CLINORIL® (суліндак), TOLECTIN® (толметин), LODINE® (етодолак), TORADOL® (кеторолак) і DAYPRO® (оксапрозин).

Інгібітори PDGFR включають без обмеження C-451, CP-673 та CP-868596.

Засоби хіміотерапії на основі платини включають без обмеження цисплатин, ELOXATIN® (оксаліплатин) ептаплатин, лобаплатин, недаплатин, PARAPLATIN® (карбоплатин), сатраплатин і пікоплатин.

Інгібітори Polo- подібних кіназ включають без обмеження BI-2536.

Інгібітори фосфоінозитид-3-кінази (PI3K) включають без обмеження вортманін, LY294002, XL-147, CAL-120, ONC-21, AEZS-127, ETP-45658, PX-866, GDC-0941, BGT226, BEZ235 та XL765.

Аналоги тромбоспондину включають без обмеження ABT-510, ABT-567, ABT-898 і TSP-1.

Інгібітори VEGFR включають без обмеження ABT-869, AEE-788, ANGIOZYME™ (рибозим, який інгібує ангіогенез (Ribozyme Pharmaceuticals (Боулдер, Колорадо) та Chiron (Емерівілль, Каліфорнія)), акситиніб (AG-13736), AZD-2171, CP-547632, CYRAMZA® (рамуцирумаб), IM-862, MACUGEN® (пегаптаміб), NEXAVAR® (сорафеніб, BAY43-9006), пазопаніб (GW-786034), ваталаніб (PTK-787, ZK-222584), SUTENT® (сунітиніб, SU-11248), STIVARGA® (регорафеніб), пастка для VEGF та ZACTIMA™ (вандетаніб, ZD-6474).

Антибіотики включають без обмеження інтеркалювальні антибіотики акларубіцин, актиноміцин D, амрубіцин, анаміцин, адріаміцин, BLENOXANE® (блеоміцин), даунорубіцин, CAELYX® або MYOCET® (ліпосомальний доксорубіцин), елсамітруцин, епірубіцин, гларубіцин, ZAVEDOS® (ідарубіцин), мітоміцин C, неморубіцин, неокарциностатин, пепломіцин, пірарубіцин, ребекаміцин, стималамер, стрептозоцин, VALSTAR® (валрубіцин) та зиностатин.

Інгібітори топоізомерази включають без обмеження акларубіцин, 9-амінокамптотецин, амонафід, амсакрин, бекатекарин, белотекан, BN-80915, CAMPTOSAR® (іринотекану гідрохлорид), камптотецин, CARDIOXANE® (дексразоксин), дифломотекан, едотекарин, ELLENCE® або PHARMORUBICIN® (епірубіцин), етопозид, ексатекан, 10-гідроксикамптотецин,

гіматекан, луртотекан, мітоксантрон, Onivyde™ (ліпосомальний іринотекан), оратецин, пірарбуцин, піксантрон, рубітекан, собузоксан, SN-38, тафлупозид і топотекан.

Антитіла включають без обмеження AVASTIN® (бевацизумаб), CD40-специфічні антитіла, chTNT-1/B, деносумаб, ERBITUX® (цетуксимаб), HUMAX-CD4® (заволімумаб), IGFIR-специфічні антитіла, лінтузумаб, OX-40-специфічні антитіла, PANOREX® (едреколомаб), RENCAREX® (WX G250), RITUXAN® (ритуксимаб), тицилімумаб, трастузумаб, пертузумаб, VECTIBIX® (панітумумаб) та антитіла до CD20 типів I та II.

Засоби гормональної терапії включають без обмеження ARIMIDEX® (анастрозол), AROMASIN® (екземестан), арзоксифен, CASODEX® (бікалутамід), CETROTIDE® (цетрорелікс), дегарелікс, деслорелін, DESOPAN® (трилостан), дексаметазон, DROGENIL® (флутамід), EVISTA® (ралоксифен), AFEMA™ (фадрозол), FARESTON® (тореміфен), FASLODEX® (фулвестрант), FEMARA® (летрозол), форместан, глюкокортикоїди, HECTOROL® (доксеркальциферол), RENAGEL® (севеламеру карбонат), лазофоксифен, лейпроліду ацетат, MEGACE® (мегестерол), MIFEPREX® (міфепристон), NILANDRON™ (нілутамід), NOLVADEX® (тамоксифену цитрат), PLENAXIS™ (абарелікс), преднізон, PROPECIA® (фінастерид), рилостан, SUPREFACT® (бусерелін), TRELSTAR® (рилізинг-фактор лютеїнізуючого гормону (LHRH)), VANTAS® (імплантат з гістреліном), VETORYL® (трилостан або модрастан) і ZOLADEX® (фосрелін, гозерелін).

Дельтоїди та ретиноїди включають без обмеження сеокальцитол (EB1089, CB1093), лексакальцитрол (KH1060), фенретинід, PANRETIN® (аліретиноїн), ATRAGEN® (ліпосомальний третиноїн), TARGRETIN® (бексаротен) і LGD-1550.

Інгібітори PARP включають без обмеження ABT-888 (веліпариб), KU-59436, AZD-2281 (олапариб), AG-014699 (рукапариб), MK4827 (нірапариб), BMN-673 (талазопариб), ініпариб, BSI-201, BGP-15, INO-1001 та ONO-2231.

Рослинні алкалоїди включають без обмеження вінкристин, вінбластин, віндезин і вінорелбін.

Інгібітори протеасом включають без обмеження VELCADE® (бортезоміб), KYPROLIS® (карфілзоміб), MG132, NPI-0052 та PR-171.

Приклади імунологічних засобів включають без обмеження інтерферони, інгібітори контрольних точок імунної відповіді, костимулювальні засоби та інші імунозміцнювальні засоби. Інтерферони включають інтерферон альфа, інтерферон альфа-2a, інтерферон альфа-2b, інтерферон бета, інтерферон гамма-1a, ACTIMMUNE® (інтерферон гамма- 1b) або інтерферон гамма-n1, їх комбінації тощо. Інгібітори контрольних точок імунної відповіді включають антитіла, які націлюються на PD-L1 (наприклад, дурвалумаб, атезолізумаб, авелумаб, MEDI4736, MSB0010718C і MPDL3280A) та CTLA4 (антиген 4 цитотоксичних лімфоцитів; наприклад, іпілімумаб, тремелімумаб). Костимулювальні засоби включають без обмеження антитіла проти CD3, CD40, CD40L, CD27, CD28, CSF1R, CD137 (наприклад, урелумаб), B7H1, GITR, ICOS, CD80, CD86, OX40, OX40L, CD70, HLA-DR, LIGHT, LIGHT-R, TIM3, A2AR, NKG2A, KIR (наприклад, лірилумаб), TGF-β (наприклад, фрезолімумаб) та їх комбінації.

Інші засоби включають без обмеження ALFAFERONE® (IFN-α), BAM-002 (окиснений глутатіон), BEROMUN® (тасонермін), BEXXAR® (тозитумомаб), CAMPATH® (алемтузумаб), дакарбазин, денілейкін, епратузумаб, GRANOCYTE® (ленограстим), лентинан, лейкоцитарний альфа інтерферон, іміквімод. вакцину проти меланоми, мітумомаб, молграмостим, MYLOTARG™ (гемтузумаб озогаміцин), NEUPOGEN® (філграстим), OncoVAC-CL, OVAREX® (ореговомаб), пемтумомаб (Y-muHMFG1), PROVENGE® (сипулейцел-T), саргарамостим, сизофілан, тецелейкін, THERACYS® (бацила Кальмета-Герена), убенімекс, VIRULIZIN® (імунотерапевтичний засіб, Lorus Pharmaceuticals), Z-100 (специфічна речовина Маруяма (SSM)), WF-10 (тетрахлордекаоксид (TCDO)), PROLEUKIN® (альдеслейкін), ZADAXIN® (тималфазин), ZINBRYTA® (даклізумаб, одержаний високопродуктивним способом) і ZEVALIN® (^{90}Y-ібритумомаб тіуксетан).

Модифікатори біологічної відповіді являють собою засоби, які модифікують захисні механізми живих організмів або біологічні відповіді, такі як виживання, ріст або диференціювання клітин тканин, спрямовуючи їх таким чином, щоб вони проявляли протипухлинну активність, та вони включають без обмеження крестин, лентинан, сизофіран, піцибаніл PF-3512676 (CpG-8954) та убенімекс.

Аналоги піримідинів включають без обмеження цитарабін (ara C або арабінозид C), цитозин-арабінозид, доксифлуридин, FLUDARA® (флударабін), 5-FU (5-фторурацил), флоксуридин, GEMZAR® (гемцитабін), TOMUDEX® (ратитрексед) і TROXATYL™ (триацетилуридин троксацитабін).

Аналоги пуринів включають без обмеження LANVIS® (тіогуанін) та PURINETHOL® (меркаптопурин).

Антимітотичні засоби включають без обмеження батабулін, епотилон D (KOS-862), N-(2-((4-гідроксифеніл)аміно)піридин-3-іл)-4-метоксибензолсульфонамід, іксабепілон (BMS 247550), TAXOL® (паклітаксел), TAXOTERE® (доцетаксел), PNU100940 (109881), патупілон, XRP-9881 (ларотаксел), вінфлунін і ZK-EPO (синтетичний епотилон).

Інгібітори убіквітин-лігаз включають без обмеження інгібітори MDM2, такі як нутліни, та інгібітори NEDD8, такі як MLN4924.

Антитіла до PD-1 також можна застосовувати для підвищення ефективності променевої терапії. Приклади променевої терапії включають зовнішню дистанційну променеву терапію, внутрішню променеву терапію (тобто брахітерапію) та системну променеву терапію.

Антитіла до PD-1 можна вводити додатково або разом з іншими хіміотерапевтичними засобами, такими як ABRAXANE™ (ABI-007), ABT-100 (інгібітор фарнезилтрансферази), ADVEXIN® (вакцина Ad5CMV-p53), ALTOCOR® або MEVACOR® (ловастатин), AMPLIGEN® (полі I:полі C12U, синтетична РНК), APTOSYN® (ексисулінд), AREDIA® (памідронова кислота), арглабін, L-аспарагіназа, атаместан (1-метил-3,17-діон-андроста-1,4-дієн), AVAGE® (тазаротен), AVE-8062 (похідна комбреастатину), BEC2 (мітумомаб), кахектин або кахексии (фактор некрозу пухлини), канваксин (вакцина), CEAVAC® (протиракова вакцина), CELEUK® (целмолейкін), CEPLENE® (гістаміну дигідрохлорид), CERVARIX® (вакцина проти вірусу папіломи людини), CHOP® (C: CYTOXAN® (циклофосфамід); H: ADRIAMYCIN® (гідроксидоксорубіцин); O: вінкристин (ONCOVIN®); P: преднізон), CYPAT™ (ципротерону ацетат), комбрестатин A4P, DAB(389)EGF (каталітичний та транслокаційний домени дифтерійного токсину, злиті за допомогою лінкера His-Ala з епідермальним фактором росту людини) або TransMID-107R™ (дифтерійні токсини), дакарбазин, дактиноміцин, 5,6-диметилксантенон-4-оцтова кислота (DMXAA), енілурацил, EVIZON™ (скваламіну лактат), DIMERICINE® (ліпосомний лосьйон T4N5), дискодермолід, DX-8951 f (ексатекану мезилат), ензастаурин, EPO906 (епотилон B), GARDASIL® (квадривалентна рекомбінантна вакцина проти вірусу папіломи людини (типів 6, 11, 16, 18)), GASTRIMMUNE®, GENASENSE®, GMK (гангліозид-кон'югована вакцина), GVAX® (вакцина проти раку передміхурової залози), галофугінон, гістерелін, гідроксикарбамід, ібандронова кислота, IGN-101, IL-13-PE38, IL-13-PE38QQR (цинтредекіну бесудотокс), IL-13-псевдомонадний екзотоксин, інтерферон-α, інтерферон-γ, JUNOVAN™ або MEP ACT™ (міфамуртид), лонафарніб, 5,10-метилентетрагідрофолат, мілтефозин (гексадецилфосфохолін), NEOVASTAT® (AE-941), NEUTREXIN® (триметрексату глюкуронат), NIPENT® (пентостатин), ONCONASE® (фермент рибонуклеаза), ONCOPHAGE® (вакцина для лікування меланоми), ONCOVAX® (IL-2 вакцина), ORATHECIN™ (рубітекан), OSIDEM® (лікарський засіб на основі клітин та антитіла), OVAREX® MAb (мишаче моноклональне антитіло), паклітаксел, PANDIMEX™ (агліконові сапоніни з женьшеню, що містять 20(S)-протопанаксадіол (aPPD) і 20(S)-протопанаксатріол (aPPT)), панітумумаб, PANVAC®-VF (експериментальна протиракова вакцина), пегаспаргаза, PEG-інтерферон A, феноксодіол, прокарбазин, ребімастат, REMOVAB® (катумаксомаб), REVLIMID® (леналідомід), RSR13 (ефапроксірал), SOMATULINE® LA (ланреотид), SORIATANE® (ацитретин), стауроспорин (Streptomyces staurospores), талабостат (PT100), TARGRETIN® (бексаротен), TAXOPREXIN® (DHA-паклітаксел), TELCYTA® (канфосфамід, TLK286), теміліфен, TEMODAR® (темозоломід), тесміліфен, талідомід, THERATOPE® (STn-KLH), тимітак (2-аміно-3,4-дигідро-6-метил-4-оксо-5-(4-піридилтіо)хіназоліну дигідрохлорид), TNFERADE™ (аденовектор: ДНК-носій, який містить ген фактору некрозу пухлини α), TRACLEER® або ZAVESCA® (бозентан), третиноїн (ретин-A), тетрандрин, TRISENOX® (триоксид миш'яку), VIRULIZIN®, украін (похідна алкалоїдів з чистотілу великого), вітаксин (антитіло до $\alpha v\beta 3$), XCYTRIN® (мотексафін гадолінію), XINLAY™ (атразентан), XYOTAX™ (паклітаксел поліглюмекс), YONDELIS® (трабектедин), ZD-6126, ZINECARD® (дексразоксан), ZOMETA® (золедронова кислота) та зорубіцин, а також комбінації будь-яких з цих засобів.

У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 вводять додатково або разом із кон'югатом антитіло-лікарський засіб, націленим на кіназу c-Met, для лікування недрібноклітинного раку легені, раку голови та шиї, раку підшлункової залози, колоректального раку або раку шлунку.

У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 вводять додатково або разом із кон'югатом антитіло-лікарський засіб, націленим на LRRC15, для лікування недрібноклітинного раку легені, раку голови та шиї, раку підшлункової залози, саркоми, тричі негативного раку молочної залози або меланоми.

У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 вводять додатково або разом із кон'югатом антитіло-лікарський засіб, націленим на EGFR, для лікування гліобластоми.

У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 вводять додатково або разом із кон'югатом антитіло-лікарський засіб, націленим на CS1, для лікування злоякісного захворювання крові, такого як множинна мієлома.

У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 вводять додатково або разом із кон'югатом антитіло-лікарський засіб, націленим на DLL3, для лікування дрібноклітинного раку легені або гліобластоми.

У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 вводять додатково або разом із білком, спрямованим проти CD40, для лікування раку голови та шиї, раку легені (такого як аденокарцинома, недрібноклітинний рак легені, мезотеліома, дрібноклітинний рак легені), меланоми, раку яєчника або раку підшлункової залози.

У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 вводять додатково або разом із венетоклаксом для лікування злоякісного захворювання крові, такого як хронічний лімфоцитарний лейкоз.

У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 вводять додатково або разом із ібрутинібом для лікування злоякісного захворювання крові, такого як хронічний лімфоцитарний лейкоз, лімфома з клітин мантійної зони або макроглобулінемія Вальденстрема, або солідної пухлини.

У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 вводять додатково або разом із іпілімумабом та кон'югатом антитіло-лікарський засіб, націленим на кіназу c-Met, для лікування недрібноклітинного раку легені.

У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 вводять додатково або разом із іпілімумабом та кон'югатом антитіло-лікарський засіб, націленим на LRRC15, для лікування недрібноклітинного раку легені.

7.7. Дози та схеми введення

Кількість антитіл до PD-1, які вводяться, буде залежати від багатьох факторів, включаючи без обмеження конкретний тип солідної пухлини, що підлягає лікуванню, стадію солідної пухлини, що підлягає лікуванню, спосіб уведення, частоту введення, необхідний терапевтичний ефект та інші параметри, такі як вік, маса та інші характеристики пацієнта тощо. Визначення доз, ефективних для забезпечення терапевтичного ефекту за конкретних шляхів і частоти введення, перебуває в межах можливостей фахівців у даній галузі.

Дози, ефективні для забезпечення терапевтичного ефекту, можна спочатку оцінити на тваринних моделях in vivo або за клінічних умов. Придатні тваринні моделі для багатьох захворювань відомі з рівня техніки.

Антитіла до PD-1, розкриті в даному документі, можна вводити будь-яким шляхом, придатним для стану, що підлягає лікуванню. У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 являє собою будь-яке з гуманізованих антитіл, перерахованих у таблиці 3. У конкретному варіанті здійснення антитіло до PD-1 має важкий ланцюг згідно з SEQ ID NO:51 або SEQ ID NO:52 та легкий ланцюг згідно з SEQ ID NO:61. Антитіло до PD-1 зазвичай будуть вводити парентерально, тобто за допомогою інфузії, підшкірної, внутрішньом'язової, внутрішньовенної (IV), внутрішньо шкірної, інтратекальної, болюсної ін'єкції, внутрішньо пухлинної ін'єкції або епідуральної ін'єкції ((Shire et el., 2004, J. Pharm. Sciences 93(6):1390-1402)). В одному варіанті здійснення антитіло до PD-1 представлене у вигляді ліофілізованого порошку у флаконі. Флакони можуть містити 100 мг, 110 мг, 120 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг або 400 мг антитіла до PD-1. Перед введенням ліофілізований порошок відновлюють стерильною водою для ін'єкцій (SWFI) або іншим придатним середовищем з одержанням розчину, що містить 20 мг/мл антитіла до PD-1. У деяких варіантах здійснення одержаний відновлений розчин додатково розбавляють сольовим розчином або іншим придатним середовищем для інфузій та вводять шляхом IV інфузії два рази на 7 днів, один раз на 7 днів, один раз на 14 днів, один раз на 21 день, один раз на 28 днів, один раз на 35 днів, один раз на 42 дні, один раз на 49 днів або один раз на 56 днів. У деяких варіантах здійснення в рамках першого циклу інфузію виконують протягом 90 хвилин. У деяких варіантах здійснення наступні інфузії виконують протягом 60 хвилин.

У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 вводять як IV інфузію один раз на 7 днів із розрахунку 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0мг/кг, 2,0 мг/кг, 3,0 мг/кг, 4,0 мг/кг, 5,0 мг/кг, 6,0 мг/кг, 8,0 мг/кг або 10,0 мг/кг.

У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 вводять як IV інфузію один раз на 14 днів із розрахунку 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 2,0 мг/кг, 3,0 мг/кг, 4,0 мг/кг, 5,0 мг/кг, 6,0 мг/кг, 8,0 мг/кг або 10,0 мг/кг.

У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 вводять як IV інфузію один раз на 21 день із розрахунку 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 2,0 мг/кг, 3,0 мг/кг, 4,0 мг/кг, 5,0 мг/кг, 6,0 мг/кг, 8,0 мг/кг або 10,0 мг/кг.

У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 вводять як IV інфузію один раз на 28 днів із розрахунку 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 2,0 мг/кг, 3,0 мг/кг, 4,0 мг/кг, 5,0 мг/кг, 6,0 мг/кг, 8,0 мг/кг або 10,0 мг/кг.

В одному ілюстративному варіанті здійснення антитіло до PD-1 застосовують додатково до іпілімумабу (YERVOY®) для лікування не дрібноклітинного раку легені. Антитіло до PD-1 вводять шляхом IV інфузії один раз на 21 день із розрахунку 1,0 мг/кг або 3,0 мг/кг. Іпілімумаб вводять шляхом внутрішньовенної інфузії у дозі 1 мг/кг один раз на три тижні протягом чотирьох доз. Після останньої дози іпілімумабу антитіло до PD-1 вводять шляхом IV інфузії один раз на 14 днів із розрахунку 1,0 мг/кг або 3,0 мг/кг. Терапію антитілом до PD-1 додатково до іпілімумабу продовжують до моменту прогресування захворювання або допоки пацієнт витримує лікування.

В одному ілюстративному варіанті здійснення антитіло до PD-1 застосовують додатково до іпілімумабу (YERVOY®) для лікування не дрібноклітинного раку легені. Антитіло до PD-1 вводять шляхом IV інфузії один раз на 14 днів із розрахунку 1,0 мг/кг або 3,0 мг/кг. Іпілімумаб вводять шляхом внутрішньовенної інфузії в дозі 1 мг/кг один раз на шість тижнів протягом чотирьох доз. Терапію антитілом до PD-1 додатково до іпілімумабу продовжують до моменту прогресування захворювання або допоки пацієнт витримує лікування.

В одному ілюстративному варіанті здійснення антитіло до PD-1 застосовують додатково до іпілімумабу (YERVOY®) для лікування недрібноклітинного раку легені. Антитіло до PD-1 вводять шляхом IV інфузії один раз на 14 днів із розрахунку 1,0 мг/кг або 3,0 мг/кг. Іпілімумаб вводять шляхом внутрішньовенної інфузії в дозі 1 мг/кг один раз на дванадцять тижнів протягом чотирьох доз. Терапію антитілом до PD-1 додатково до іпілімумабу продовжують до моменту прогресування захворювання або допоки пацієнт витримує лікування.

У разі введення додатково або спільно з іншими засобами, такими як інші хіміотерапетивтичні засоби, антитіла до PD-1 можна вводити за тією самою схемою, що й інший(інші) засіб(засоби), або за іншою схемою. У разі введення за тією самою схемою антитіло до PD-1 можна вводити перед іншим засобом, після нього або одночасно з ним. У деяких варіантах здійснення, де антитіло до PD-1 вводять додатково або спільно зі стандартами лікування, антитіло до PD-1 можна починати вводити до початку здійснення стандартної терапії, наприклад, за день, за декілька днів, за тиждень, за декілька тижнів, за місяць або навіть за декілька місяців до початку здійснення терапії, яка є стандартом лікування. У деяких варіантах здійснення, де антитіло до PD-1 вводять додатково або разом із стандартами лікування, антитіло до PD-1 можна починати вводити після початку прийому стандартної терапії, наприклад, через день, через кілька днів, через тиждень, через кілька тижнів, через місяць або навіть кілька місяців після о початку здійснення терапії, яка є стандартом лікування.

Як буде зрозуміло фахівцям у даній галузі, рекомендовані дози для різних засобів, описаних вище, може бути потрібно скоригувати для оптимізації відповіді пацієнта та одержання максимального терапевтичного ефекту.

7.8. Ілюстративні варіанти здійснення

Нижче наведені ілюстративні пронумеровані варіанти здійснення даного винаходу.

1. Зв'язувальний білок на основі антитіла до PD-1, який містить (i) ланцюг V_H, який містить три CDR; та (ii) ланцюг V_L, який містить три CDR, де: CDR № 1 V_H являє собою GYTFTHYGMN (SEQ ID NO:11); CDR № 2 V_H являє собою WVNTYTGEPTYADDFKG (SEQ ID NO:12); CDR № 3 V_H являє собою EGEGLGFGD (SEQ ID NO:13); CDR № 1 V_L являє собою RSSQSIVHSHGDTYLE (SEQ ID NO:14); CDR № 2 V_L являє собою KVSNRFS (SEQ ID NO:15); і CDR № 3 V_L являє собою FQGSHIPVT (SEQ ID NO: 16).

2. Зв'язувальний білок на основі антитіла до PD-1 згідно з варіантом здійснення 1, який містить ланцюг V_H, послідовність якого відповідає SEQ ID NO:31; та ланцюг V_L, послідовність якого відповідає SEQ ID NO:41.

3. Зв'язувальний білок на основі антитіла до PD-1 згідно з варіантом здійснення 1, який є гуманізованим.

4. Зв'язувальний білок на основі антитіла до PD-1 згідно з варіантом здійснення 3, який містить ланцюг V_H, послідовність якого відповідає SEQ ID NO:36; та ланцюг V_L, послідовність якого відповідає SEQ ID NO:42.

5. Зв'язувальний білок на основі антитіла до PD-1, який містить (i) ланцюг V_H, який містить три CDR; та (ii) ланцюг V_L, який містить три CDR, де: CDR № 1 V_L являє собою GYTFTHYGMN (SEQ ID NO:11); CDR № 2 V_H являє собою WVNTYTGEPTYADDFKG (SEQ ID NO:12); CDR № 3 V_H являє собою EGEGMGFGD (SEQ ID NO:23); CDR № 1 V_L являє собою RSSQSIVHSHGDTYLE (SEQ ID NO:14); CDR № 2 V_L являє собою KVSNRFS (SEQ ID NO:15); і CDR № 3 V_L являє собою FQGSHIPVT (SEQ ID NO:16).

6. Зв'язувальний білок на основі антитіла до PD-1 згідно з варіантом здійснення 5, який містить ланцюг V_H, послідовність якого відповідає SEQ ID NO:33; та ланцюг V_L, послідовність якого відповідає SEQ ID NO:42.

7. Зв'язувальний білок на основі антитіла до PD-1 згідно з будь-яким із варіантів здійснення 1-6, який являє собою IgG.

8. Зв'язувальний білок на основі антитіла до PD-1 згідно з варіантом здійснення 7, який являє собою IgG_1, що необов'язково містить варіантний домен CH2, який містить амінокислотні заміни L234A та L235A.

9. Зв'язувальний білок на основі антитіла до PD-1 згідно з варіантом здійснення 7, який являє собою IgG_4, що необов'язково містить варіантну ділянку Fc, яка містить амінокислотну заміну S228P.

10. Зв'язувальний білок на основі антитіла до PD-1 згідно з варіантом здійснення 8, який містить важкий ланцюг, що відповідає послідовності під SEQ ID NO:51 або SEQ ID NO:52, та легкий ланцюг, що відповідає послідовності під SEQ ID NO:61.

11. Зв'язувальний білок на основі антитіла до PD-1 згідно з будь-яким із варіантів здійснення 1-10, який характеризується Ко, що становить менше приблизно 100 нМ.

12. Зв'язувальний білок на основі антитіла до PD-1 згідно з варіантом здійснення 11, який характеризується Ко, що становить менше приблизно 10 нМ.

13. Фармацевтична композиція, яка містить зв'язувальний білок на основі антитіла до PD-1 згідно з будь-яким із варіантів здійснення 1-12 та фармацевтично прийнятний носій.

14. Нуклеїнова кислота, яка містить нуклеотидну послідовність, що кодує зв'язувальний білок на основі антитіла до PD-1 згідно з будь-яким із варіантів здійснення 1-12.

15. Вектор, який містить нуклеїнову кислоту згідно з варіантом здійснення 14.

16. Прокаріотична клітина-хазяїн, трансформована вектором згідно з варіантом здійснення 15.

17. Еукаріотична клітина-хазяїн, трансформована вектором згідно з варіантом здійснення 15.

18. Еукаріотична клітина-хазяїн, сконструйована для експресії нуклеїнової кислоти згідно з варіантом здійснення 14.

19. Еукаріотична клітина-хазяїн згідно з варіантом здійснення 18, яка являє собою клітину-хазяїна, одержану від ссавця.

20. Спосіб одержання його зв'язувального білка на основі антитіла до PD-1, що передбачає: (a) культивування клітини-хазяїна згідно з варіантом здійснення 17 або варіантом здійснення 18 та (b) виділення зв'язувального білка на основі антитіла до PD-1.

21. Спосіб активації імунної системи, що передбачає введення пацієнту, який потребує цього, зв'язувального білка на основі антитіла до PD-1 згідно з будь-яким із варіантів здійснення 1-12 або фармацевтичної композиції згідно з варіантом здійснення 13.

22. Спосіб лікування раку, що передбачає введення пацієнту, який потребує цього, зв'язувального білка на основі антитіла до PD-1 згідно з будь-яким із варіантів здійснення 1-12 або фармацевтичної композиції згідно з варіантом здійснення 13.

23. Спосіб згідно з варіантом здійснення 22, де рак вибраний із раку сечового міхура, раку молочної залози, раку голови та шиї, раку нирки, раку легені, лімфоми, меланоми та раку шлунку.

24. Спосіб згідно з варіантом здійснення 23, де рак легені являє собою не дрібноклітинний рак легені.

25. Спосіб згідно з варіантом здійснення 22, у якому зв'язувальний білок на основі антитіла до PD-1 уводять як монотерапію.

26. Спосіб згідно з варіантом здійснення 22, у якому зв'язувальний білок на основі антитіла до PD-1 вводять додатково або разом із іншим засобом, зазвичай застосовуваним для лікування раку.

27. Спосіб згідно з варіантом здійснення 26, у якому інший засіб вибраний з опромінення, хіміотерапії, кон'югату антитіла та лікарського засобу, антитіла до CD40, антитіла до CTLA-4 й антитіла до OX40.

28. Спосіб згідно з варіантом здійснення 27, у якому хіміотерапія являє собою цисплатин, карбоплатин, паклітаксел, доцетаксел, гемцитабін, вінорелбін, вінбластин, іринотекан, етопозид або пеметрексед або їхні фармацевтично прийнятні солі.

29. Спосіб згідно з варіантом здійснення 27, у якому кон'югат антитіла та лікарського засобу націлюється на кіназу c-Met.

30. Спосіб згідно з варіантом здійснення 27, у якому кон'югат антитіла та лікарського засобу націлюється на LRRC15.

31. Спосіб згідно з варіантом здійснення 27, у якому кон'югат антитіла та лікарського засобу націлюється на EGFR.

32. Спосіб згідно з варіантом здійснення 27, у якому кон'югат антитіла та лікарського засобу націлюється на CS1.

33. Спосіб згідно з варіантом здійснення 27, у якому кон'югат антитіла та лікарського засобу являє собою ровалпітузумаб тезирин.

34. Спосіб згідно з варіантом здійснення 27, у якому антитіло до CTLA-4 являє собою іпілімумаб.

8. ПРИКЛАДИ

Наступні приклади, які висвітлюють деякі ознаки та властивості варіантів здійснення антитіл до PD-1, описаних у даному документі, наведені для цілей ілюстрації, а не для обмеження.

Приклад 1. Матеріали та способи

8.1.1. Зв'язування антитіл зі зв'язаним на планшеті PD-1 людини в аналізі ELISA

96-лункові планшети Immunolon 4xHB вкривали за допомогою 1 мкг/мл злиття PD-1 людини-Fc за 4 °C протягом ночі. Планшети блокували за допомогою PBS, що містить 1 % BSA, протягом 30 хвилин за кімнатної температури, а потім тричі промивали за допомогою PBS, що містить 0,1 % Tween 20 (PBST), із застосування пристрою для відмивання планшетів. Потім планшети, вкриті PD-1, інкубували зі вказаними концентраціями антитіл за кімнатної температури (RT) протягом однієї години. Планшети чотири рази промивали за допомогою PBST і потім інкубували протягом 1 години за кімнатної температури зі 100 мкл специфічного до Fab- фрагменту людини антитіла кози, кон'югованого з біотином, приготованого у розведенні 1:5000 у PBS, що містить 1 % BSA. Планшети промивали п'ять разів у PBST та у кожну лунку додавали по 100 мкл стрептавідину, кон'югованого з HRP, у розведенні 1:1000 та інкубували протягом 30 хвилин за RT. Планшети промивали п'ять разів у PBST та у кожну лунку додавали по 100 мкл TMB One Component та інкубували за RT до появи кольору (приблизно 5-10 хвилин). Оптичну густину (OD) зчитували за 650 нм із застосуванням Spectromax190 (Molecular Devices).

8.1.2. Зв'язування антитіл з PD-1 людини, експресованим на клітинній поверхні

Клітини Jurkat, які експресують PD-1, збирали із флаконів і ресуспендували до 2 × 10^6 клітин/мл у PBS, що містить 1 % BSA. 100 мкл клітин додавали у круглодонний 96-лунковий планшет, який містить 100 мкл протитрованого досліджуваного антитіла або ізотипічного контролю. Клітини інкубували з антитілами за кімнатної температури протягом 25 хвилин, а потім двічі промивали за допомогою PBS, що містить 1 % BSA. Клітинний осад ресуспендували у 100 мкл вторинного антитіла кози до Fab людини, кон'югованого з PE, у розведенні 1:250. Після 25 хвилин інкубації за RT клітини двічі промивали за допомогою PBS, що містить 1 % BSA, та ресуспендували у 200 мкл 1 % BSA. Клітини аналізували із застосуванням проточного цитометра Becton Dickinson FACSCanto. Дані аналізували із застосуванням програмного забезпечення BD FACSDiva (версія 8.0.1).

8.1.3. Зв'язування антитіл зі зв'язаним на планшеті PD-1 макаки-крабоїда в аналізі ELISA

96-лункові планшети Immunolon 4xHB вкривали за допомогою 1 мкг/мл злиття PD-1 макаки-крабоїда-Fc у DPBS за 4 °C протягом ночі. Планшети блокували за допомогою PBS, що містить 1 % BSA, протягом 30 хвилин за RT і потім тричі промивали за допомогою PBST (PBS із 0,1 % Tween 20) із застосуванням пристрою для відмивання планшетів. Потім планшети, вкриті PD-1, інкубували зі вказаними концентраціями антитіл за кімнатної температури протягом однієї години. Планшети чотири рази промивали за допомогою PBST і потім інкубували протягом 1 години за RT зі 100 мкл специфічного до Fab-фрагменту людини антитіла кози, кон'югованого з біотином, приготованого у розведенні 1:5000 у PBS, що містить 1 % BSA. Планшети промивали п'ять разів у PBST та у кожну лунку додавали по 100 мкл стрептавідину, кон'югованого з HRP, у розведенні 1:1000 та інкубували протягом 30 хвилин за RT. У подальшому планшети п'ять разів промивали у PBST та у кожну лунку додавали 100 мкл TMB. One component та інкубували за RT до появи кольору (приблизно 5-10 хвилин). Оптичну густину (OD) зчитували за 650 нм із застосуванням Spectromax190 (Molecular Devices).

8.1.4. Зв'язування антитіл із активованими CD4+ Т-клітинами людини

Мононуклеарні клітини периферійної крові (PBMC) людини виділяли з лейкоцитарних плівок, придбаних у Stanford Blood Center (Пало-Альто, Каліфорнія). Стисло, лейкоцитарні плівки розводили у співвідношенні 1:1 за допомогою PBS без магнію та кальцію. Розведену кров (30 мл) нашаровували на 15 мл 90 % Ficoll-Paque Plus, підготованого у PBS без магнію та кальцію, який містився у пробірках SepMate. Пробірки центрифугували за 1200 g протягом 10 хвилин. Середню фазу збирали та двічі промивали в 1x PBS. PBMC культивували за 2 × 10^6 клітин/мл протягом 48 годин у середовищі RPM1, яке містить 10 % HI FCS з 1 мкг/мл PHA та 50 Од/мл рекомбінантного IL-2 людини. Клітини збирали, промивали та інкубували з антитілами за RT

протягом 25 хвилин. Мічені клітини двічі промивали за допомогою PBS, що містить 1 % BSA. Клітини ресуспендували у 100 мкл PBS+1 % BSA та додавали антитіло кози до Fab-фрагменту людини, кон'юговане з PE, та антитіло до CD4, кон'юговане з FITC, у розведенні 1:250. Через 30 хвилин клітини двічі промивали за допомогою PBS, що містить 1 % BSA, та ресуспендували у 200 мкл 1 % BSA. Клітини аналізували із застосуванням проточного цитометра Becton Dickinson FACSCanto. Дані аналізували із застосуванням програмного забезпечення BD FACSDiva (версія 8.0.1).

8.1.5. Афінність зв'язування з PD-1 в аналізі поверхневого плазмонного резонансу

Кінетичні показники зв'язування антитіл до PD-1 із рекомбінантим розчинним ECD (позаклітинним доменом) PD-1 визначали шляхом вимірювань, заснованих на поверхневому плазмонному резонансі, які виконували на пристрої Biacore T200 за 25 °C із застосуванням підходу з аналізом захоплення Fc. Рекомбінантні позаклітинні домени PD-1 людини (залишки 1-167) та PD-1 макаки-крабоїда (залишки 21-167) придбали з комерційного джерела та додатково очищували за допомогою гель-фільтрації у 10 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA. Підготовку чипа та вимірювання кінетичних показників зв'язування виконували в аналітичному буфері HBS-EP+ (10 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05 % Tween 20). Під час підготовки чипа для захоплення Fc приблизно 2000 RU поліклонального антитіла кози до Fc IgG людини, розведеного до 25 мкг/мл у 10 мМ ацетаті натрію (pH 4,5), безпосередньо іммобілізували на поверхні біосенсорного чипа CM5 із застосуванням стандартного набору для сполучення з аміном згідно з інструкціями та процедурами виробника. Фрагменти, які не прореагували, на поверхні біосенсора блокували за допомогою етаноламіну. Для вимірювань кінетичних показників зв'язування кожний цикл аналізу складався з наступних стадій: (1) захоплення досліджуваного антитіла тільки на досліджуваній поверхні; (2) введення аналіту (ECD PD-1 або тільки буфера) як над еталонною, так і над досліджуваною поверхнею, 240 мкл за 80 мкл/хв., після чого дисоціацію контролювали протягом 900 секунд за 80 мкл/хв.; та (3) регенерація поверхні захоплення за допомогою 10 мМ гідрохлориду гліцину, pH 1,5, як над еталонною, так і над досліджуваною поверхнею. Під час аналізу всі вимірювання порівнювали з поверхнею захоплення окремо (тобто без захопленого досліджуваного антитіла), а введення буферу окремо застосовували для подвійного порівняння з еталоном. Введення PD-1 перебували у діапазоні концентрацій від 900 нМ до 11,1 нМ, що являли собою рандомізовану серію 3-кратних розведень. Дані обробляли та глобально апроксимували до моделі зв'язування 1:1 із застосуванням програмного забезпечення для оцінки Biacore T200, щоб визначити кінетичні константи швидкості зв'язування, k_a ($M^{-1} \cdot c^{-1}$) і k_d (c^{-1}), та рівноважну константу дисоціації K_D (M).

8.1.6. Блокування взаємодії PD-1 із PD-L1 та PD-L2

Клітини HEK 293G, які експресують PD-1 людини, збирали з флаконів із конфлюентним шаром. Клітини ресуспендували у PBS за концентрації 2 × 10^6 клітин/мл. Клітини (1 × 10^5) додавали у кожну лунку 96-лункового планшету з V- подібним дном і клітини блокували протягом 15 хв., за 4 °C із застосуванням блокування FcR людини. В окремих планшетах готували розчини досліджуваних антитіл та ізотипічного контролю із застосуванням 3-кратного серійного розведення, починаючи з концентрації 20 мкг/мл. Клітини промивали віх PBS і в планшет, який містить клітини, додавали 50 мкл приготованих розведень антитіл та 50 мкл ліганда PD-L1 з His-міткою або ліганда PD-L2 з His-міткою (10 мкг/мл). Клітини інкубували за 4 °C протягом 30 хвилин і двічі промивали за допомогою 1x PBS. У кожну лунку додавали антитіло до His, кон'юговане з APC (50 мкл), приготоване за розведення 1:50 у PBS, та інкубували протягом 30 хвилин за 4 °C. Клітини двічі промивали, ресуспендували у PBS та виявляли на LSR II Fortessa (BD Biosciences, Сан-Хосе, Каліфорнія).

8.1.7. Аналіз відповіді алогенних змішаних лімфоцитів (MLR) людини із застосуванням очищених CD4 Т-клітин і дендритних клітин

PBMC людини виділяли з лейкоцитарних плівок, придбаних у Stanford Blood Center (Пало-Альто, Каліфорнія). Стисло, лейкоцитарні плівки розводили у співвідношенні 1:1 за допомогою PBS без магнію та кальцію. Розведену кров (30 мл) нашаровували на 15 мл 90 % Ficoll-Paque Plus, підготованого у PBS без магнію та кальцію, який містився у пробірках SepMate. Пробірки центрифугували за 1200 g протягом 10 хвилин. Середню фазу збирали та двічі промивали в 1x PBS. Клітини ресуспендували за 1 × 10^8 на мл у середовищі AIM-V, яке містить бета-меркаптоетанол. Дендритні клітини (DC) одержували шляхом культивування пластик-адгезивних PBMC у флаконах T75 за наявності 80 нг/мл GM-CSF та 50 нг/мл IL-4 протягом 7 днів. В день 5 у культури DC додавали 50 пг/мл IL-1α та 200 пг/мл TNF-α. В день 7 DC збирали з флаконів, опромінювали протягом 7,3 хвилин за 414 Р/хв., та ресуспендували до кінцевої концентрації 1 × 10^5 клітин/мл у повному середовищі (RPMI з L-глутаміном, яке містить 10 %

FBS, 1x вітамінів, що не належать до незамінних, 1 % розчину пеніциліну/стрептоміцину, 1 % пірувату натрію, 1 % HEPES). Алогенні CD4 Т-клітини людини виділяли із застосуванням набору для виділення CD4 Т-клітин. DC (1 × 10^4/лунка) та очищені CD4 Т-клітини (1 × 10^5/лунка) додавали у планшет з U-подібним дном. У планшет, який містить DC та Т-клітини, додавали досліджуване антитіло або ізотипічний контроль (10 мкг/мл). Після п'яти днів інкубації над осадову рідину збирали та аналізували на вміст IL-2 та IFN-γ із застосуванням набору гранул для цитометричного аналізу Milliplex. Вміст IFN-γ вимірювали із застосуванням системи BioRad Bioplex (Bioplex manager 6.0).

8.1.8. Відповідь на стимуляцію антигеном із застосуванням правцевого анатоксину

PBMC людини виділяли з лейкоцитарних плівок, придбаних у Stanford Blood Center, як описано раніше. Клітини ресуспендували до кінцевої концентрації 2 × 10^6 клітин/мл у середовищі AIM-V, яке містить бета-меркаптоетанол. У лунки вносили PBMC (2 × 10^5) з 0,2 мкг/мл правцевого анатоксину. Титрували антитіло та планшети інкубували протягом п'яти днів. Надосадові рідини збирали у день 5 та оцінювали на вміст IFN-γ із застосуванням набору гранул для цитометричного аналізу Milliplex. Вміст IFN-γ вимірювали із застосуванням системи BioRad Bioplex (Bioplex manager 6.0).

Приклад 2. Одержання та гуманізація мишачих антитіл до PD-1

Мишей імунізували згідно зі способами, відомими з рівня техніки (E. Harlow, D. Lane. Antibody: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1998)). Ізотип кожного моноклонального антитіла визначали із застосуванням набору для визначення ізотипу мишачих антитіл (Roche). Клони гібридом, які виробляють антитіла, що становлять інтерес, очищували, а їхні додаткові характеристики афінності визначали за допомогою поверхневого плазмонного резонансу та конкуренції з лігандами (ELISA).

Клонування та конструювання вектору експресії здійснювали за допомогою способів, відомих із рівня техніки для експресії рекомбінантних моноклональних антитіл.

Гуманізацію ділянки V антитіла проводили, як описано у Queen, C. et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989; 86:10029-10033). Канонічні структури CDR визначали згідно

3 Huang et al. (Methods, 2005; 36:35-42). Ідентифікували послідовності варіабельних ділянок зародкового типу людини з однаковими або найбільш схожими канонічними структурами CDR та відповідні послідовності V_H-, V_L- та J- сегментів людини вибирали для одержання каркасних ділянок для варіабельної ділянки антитіла до PD-1. У положеннях каркасних ділянок, в яких комп'ютерна модель давала змогу припустити значний контакт із CDR, амінокислоти з V-ділянок мишачих антитіл до PD-1 використовували замість вихідних амінокислот каркасних ділянок людини (зворотні мутації). Повні амінокислотні послідовності ділянок V_H та V_L ілюстративних мишачих та гуманізованих антитіл показані на Фіг. 2.

Мишаче антитіло до PD-1, Mu12A11, гуманізували згідно зі способом, описаним вище. Гуманізованими версіями V_H Mu12A11 були V_H Hu12A11.1b та V_H Hu12A11.2b. V_H Hu12A11.1b мала каркасні ділянки V_H 7-4-1 із чотирма зворотними мутаціями V2I, M48V, F67L та A93T. V_H Hu12A11.2b мала каркасні ділянки V_H 1-69 із сімома зворотними мутаціями V2I, M48V, V67L, I69F, A71L, E73T та A93T. Кожну з двох гуманізованих V_H могли комбінувати з гуманізованою V_L, легкого ланцюга, Hu12A11.1a, яка мала каркасні ділянки V_L 2-28 з однією зворотною мутацією I2V.

Приклад 3. Стійкість антитіл до PD-1

Стійкість ілюстративних антитіл визначали шляхом вимірювання зв'язування PD-1 антитілами після обробки за окиснювальних умов або умов зі змінною температурою.

За допомогою оцінки щодо мотиву, який зазнає впливу, ідентифікували консервативний залишок метіоніну в положенні 99 за Kabat (M99), який, як вважають, не лише доступний для розчинника, але й схильний до дезамінування. Зразки вихідного антитіла M99, Hu12A11.2b1, піддавали впливу умов пришвидшеної деградації для збільшення потенційного дезамінування (Фіг. 3A). Зразки, оброблені за допомогою 1 % пероксиду водню (1 % HP) або 1 % трет-бутилгідропероксиду (1 % TBHP), демонстрували втрату афінності зв'язування, що дозволяє припустити потенційне окиснення залишку метіоніну-99. Конструювали набір із антитіл, які містять точкові мутації у положенні M99, включно з мутаціями за типом заміни на ізолейцин (M99I, Hu12A11.2b2, що має V_H згідно з SEQ ID NO:34), валін (M99V, Hu12A11.2b3, що має V_H згідно з SEQ ID NO:35) та лейцин (M99L, Hu12A11.2b4, що має V_H згідно з SEQ ID NO:36). Варіанти антитіла піддавали скринінгу на зв'язування з клітинами Jurkat, трансфікованими PD-1 людини, та визначали значення ECso (Фіг. 3B). Усі три антитіла, які містять точкові мутації, аналогічним чином зв'язувались із PD-1 на клітинній поверхні, але антитіло з варіантом M99L показало вищу активність зв'язування у порівнянні з варіантами M99V або M99I.

Виявили, що варіант M99L, Hu12A11.2b4, повністю зберігає зв'язувальну здатність після тестування температурної стійкості (Фіг. 3C). Інкубація Hu12A11.2b4 за -80, 5, 25 або 40 °C не спричинила значущої втрати активності з точки зору EC_{50} або максимальної інтенсивності флуоресценції (MFI).

Приклад 4. Афінність зв'язування антитіл до PD-1

В таблиці 4-1 показані дані щодо in vitro афінності зв'язування ілюстративного антитіла Hu12A11.2b4 у порівнянні з відомим з літератури антитілом до PD-1, ніволумабом, одержаним згідно з процедурами з патенту США № 9073994. Hu12A11.2b4 виявляло властивості зв'язування з PD-1, аналогічні таким для ніволумабу згідно з даними поверхневого плазмонного резонансу, аналізу ELISA з PD-1 людини (Hu) або макаки-крабоїда (Cyno) або аналізу з клітинами Jurkat людини, як виміряно в аналізах з прикладу 1.

Таблиця 4-1

Властивості зв'язування вибраних антитіл до PD-1

Антитіло	SPR, K_D (M)*	Hu ELISA, EC_{50} (пМ)	Hu ELISA, OD_{650} max	Cyno ELISA, EC_{50} (пМ)	Hu Jurkat, EC_{50} (пМ)
Ніволумаб	2,9E-09	101	2,2	70	56
Hu12A11.2b4	2,1E-09	197	2,9	102	45

*SPR = поверхневий плазмонний резонанс, як визначено згідно з прикладом 1; наведено експоненційне позначення чисел (наприклад, 3,0E-09=3,0 × 10^{-9}).

Приклад 5. Біологічна активність антитіла до PD-1 Hu12A11.2b4

Hr12A11.2b4 оцінювали щодо біологічної активності у цілій низці in vitro аналізів на клітинах людини, описаних у прикладі 1. Як показано у таблиці 5-1, Hu12A11.2b4 продемонстрував зв'язування з PD-1 у CD4+ Т-клітинах на рівні 180 пМ. Крім того було показано, що активність Hu12A11.2b4, спрямована проти PD-1, щонайменше частково опосередкована його здатністю блокувати взаємодію PD-L1 або PD-L2 з PD-1, як оцінено за допомогою проточної цитометрії. Дана біологічна активність відповідала активності Hu12A11.2b4 щодо рекомбінантних Т-клітин Jurkat, які експресують ген люциферази світляка під контролем елементів відгуку NFAT з конститутивною експресією PD-1 людини (аналіз Jurkat NFAT).

Таблиця 5-1

Біологічна 1 активність ілюстративних антитіл до PD-1

Антитіло	EC_{50} зв'язування CD4+ Т-клітин (пМ)	Блокування PD-L1 (мкг/мл)	Блокування PD-L2 (мкг/мл)	Jurkat NFAT EC_{50} (мкг/мл)
Ніволумаб	180	0,106	0,233	15±20
Hu12A11.2b4	180	0,045	0,132	4,5±6,5

Антитіло до PD-1, Hu12A11.2b4, додатково продемонструвало збільшення імунологічної відповіді у in vitro аналізах. Як показано на Фіг. 4A, обробка культур змішаних лейкоцитів за допомогою 10 мкг/мл Hu12A11.2b4 вела до значущого підвищення вмісту IL-2, а також підвищення вмісту IFN-γ у приблизно 7,4 раза. На Фіг. 4B показано, що у разі застосування Hu12A11.2b4 із розрахунку 10 мкг/мл виявляли відповідь на стимуляцію правцевим анатоксином, яка приблизно у 6 разів перевищувала відсутність обробки антитілом, за EC_{50}=161 нг/мл.

Спостережувана in vitro біологічна активність Hu12A11.2b4 була аналогічною такій, виміряній у ніволумабу, застосовуваного у прикладі 4. З точки зору імунологічної відповіді під час застосування антитіла порівняння, ніволумабу, з розрахунку 10 мкг/мл виявлялось підвищення вмісту IFN-γ у приблизно 5,6 разів у MLR, а під час відповіді на стимуляцію правцевим анатоксином - у приблизно 6 разів у порівнянні з відсутністю обробки антитілом, за EC_{50}=218 нг/мл.

Усі публікації, патенти, заявки на патент та інші документи, процитовані в даній заявці, цим включені за допомогою посилання у всій своїй повноті для всіх цілей тією мірою, як якби було окремо вказано, що кожна окрема публікація, патент, заявка на патент або інший документ включені за допомогою посилання для всіх цілей.

Хоча були проілюстровані та описані різні конкретні варіанти здійснення, буде зрозуміло, що можуть здійснюватися різні зміни без відхилення від суті та обсягу винаходу (винаходів).

<110> ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC.
<120> АНТИТІЛА ДО PD-1 ТА ШЛЯХИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ
<130> 381493-327W
<140>
<141>
<150> 62/394,314
<151> 2016-09-14
<160>61
<170> PatentIn версія 3.5
<210> 1
<211>288
<212> Білок
<213> Homo sapiens
<400> 1

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190
Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240
Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285
<210> 2
<211>288
<212> Білок
<213>Mus sp.
<400> 2
Met Trp Val Arg Gln Val Pro Trp Ser Phe Thr Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Ser Trp Gln Ser Gly Trp Leu Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp
20 25 30

Arg Ser Leu Thr Phe Tyr Pro Ala Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala
35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Leu Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Met
50 55 60

Leu Asn Trp Asn Arg Leu Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala
65 70 75 80

Ala Phe Cys Asn Gly Leu Ser Gln Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln
85 90 95

Ile Ile Gln Leu Pro Asn Arg His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp
100 105 110

Thr Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125

His Pro Lys Ala Lys Ile Glu Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val
130 135 140

Thr Glu Arg Ile Leu Glu Thr Ser Thr Arg Tyr Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Lys Pro Glu Gly Arg Phe Gln Gly Met Val Ile Gly Ile Met Ser Ala
165 170 175

Leu Val Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Leu Ala Trp Ala Leu Ala Val
180 185 190

Phe Cys Ser Thr Ser Met Ser Glu Ala Arg Gly Ala Gly Ser Lys Asp
195 200 205

Asp Thr Leu Lys Glu Glu Pro Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Val Ala
210 215 220

Tyr Glu Glu Leu Asp Phe Gln Gly Arg Glu Lys Thr Pro Glu Leu Pro
225 230 235 240

Thr Ala Cys Val His Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Thr Glu Gly
245 250 255

Leu Gly Ala Ser Ala Met Gly Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Leu Gln
260 265 270

Gly Pro Arg Pro Pro Arg His Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210>3
<211>290
<212> Білок
<213> Homo sapiens
<400> 3

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
275 280 285

Glu Thr
290

<210>4
<211>262
<212> Білок
<213> Homo sapiens
<400> 4

Leu Gln Leu His Gln Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys
1 5 10 15

Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn
20 25 30

Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu
35 40 45

Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu

50 55 60

Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln
65 70 75 80

Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly
85 90 95

Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr
100 105 110

Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val
115 120 125

Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp
130 135 140

Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu
145 150 155 160

Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly
165 170 175

Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr
180 185 190

Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro
195 200 205

Thr Trp Leu Leu His Ile Phe Ile Pro Ser Cys Ile Ile Ala Phe Ile
210 215 220

Phe Ile Ala Thr Val Ile Ala Leu Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu
225 230 235 240

Tyr Ser Ser Lys Asp Thr Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg
245 250 255

Glu Val Asn Ser Ala Ile
260

<210>5

<211> 15

<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"
<400> 5
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210>6
<400> 6
000
<210>7
<400> 7
000
<210> 8
<400> 8
000
<210>9
<400> 9
000
<210> 10
<400> 10
000
<210> 11
<211> 10
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"
<400> 11
Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr Gly Met Asn
1 5 10
<210>12
<211> 17
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"
<400> 12
Trp Val Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly
<210>13
<211>9
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"
<400> 13
Glu Gly Glu Gly Leu Gly Phe Gly Asp
1 5
<210> 14
<211> 16
<212> Білок

<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"
<400> 14
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser His Gly Asp Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15
<210> 15
<211>7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"
<400> 15
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
<210>16
<211>9
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"
<400> 16
Phe Gln Gly Ser His Ile Pro Val Thr
1 5
<210> 17
<400> 17
000
<210> 18
<400> 18
000
<210> 19
<400> 19
000
<210>20
<400> 20
000
<210>21
<211>9
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"
<400> 21
Glu Gly Glu Gly Ile Gly Phe Gly Asp
1 5
<210>22
<211>9
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"
<400> 22
Glu Gly Glu Gly Val Gly Phe Gly Asp
1 5

<210> 23
<211>9
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"
<400> 23
Glu Gly Glu Gly Met Gly Phe Gly Asp
1 5
<210> 24
<400> 24
000
<210>25
<400> 25
000
<210>26
<400> 26
000
<210>27
<400> 27
000
<210>28
<400> 28
000
<210>29
<400> 29
000
<210>30
<400> 30
000
<210>31
<211>118
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"
<400> 31
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Met Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Val
35 40 45

Gly Trp Val Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Leu Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Thr Arg Glu Gly Glu Gly Met Gly Phe Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210>32
<211>118
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"
<400> 32

Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Val Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Leu Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Glu Gly Glu Gly Met Gly Phe Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211>118
<212> Білок

<213> Штучна послідовність
<220>

Thr Arg Glu Gly Glu Gly Met Gly Phe Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 34
<211>118
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"
<400> 34

Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Val Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Leu Thr Phe Thr Leu 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

Thr Arg Glu Gly Glu Gly Ile Gly Phe Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
<211>118
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"
<400> 35

Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Val Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Leu Thr Phe Thr Leu 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
Thr Arg Glu Gly Glu Gly Val Gly Phe Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115
<210>36
<211>118
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"
<400> 36
Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Val Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Leu Thr Phe Thr Leu 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

Thr Arg Glu Gly Glu Gly Leu Gly Phe Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210>37
<400> 37
000
<210> 38
<400> 38
000
<210>39
<400> 39
000
<210>40
<400> 40
000
<210>41
<211>112
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"
<400> 41

Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

His Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser His Ile Pro Val Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210>42
<211>112
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"
<400> 42
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

His Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Ile Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210>43
<400> 43
000
<210>44
<400> 44
000
<210>45
<400> 45
000
<210>46
<400> 46
000
<210>47
<400> 47
000
<210>48
<400> 48
000
<210>49
<400> 49
000
<210> 50
<400> 50
000
<210>51
<211>448
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"
<400> 51

Gly Trp Val Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Leu Thr Phe Thr Leu 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

Thr Arg Glu Gly Glu Gly Leu Gly Phe Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210>52
<211>447
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"
<400> 52

Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Val Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Leu Thr Phe Thr Leu 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

Thr Arg Glu Gly Glu Gly Leu Gly Phe Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210>53
<400> 53

000
<210> 54
<400> 5
000
<210>55
<400> 55
000
<210>56
<400> 56
000
<210>57
<400> 57
000
<210>58
<400> 58
000
<210>59
<400> 59
000
<210> 60
<400> 60
000
<210>61
<211>219
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело
<223>/примітка ="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"
<400> 61

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

His Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Ile Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Антитіло до PD-1 людини, яке містить (i) ланцюг V_H, що містить три CDR; і (ii) ланцюг V_L, що містить три CDR, де:
CDR № 1 V_H являє собою GYTFTHYGMN (SEQ ID NO: 11);
CDR № 2 V_H являє собою WVNTYTGEPTYADDFKG (SEQ ID NO: 12);
CDR № 3 V_H являє собою EGEGLGFGD (SEQ ID NO: 13);
CDR № 1 V_L являє собою RSSQSIVHSHGDTYLE (SEQ ID NO: 14);
CDR № 2 V_L являє собою KVSNRFS (SEQ ID NO: 15); і
CDR № 3 V_L являє собою FQGSHIPVT (SEQ ID NO: 16).
2. Антитіло до PD-1 людини за п. 1, яке є гуманізованим.
3. Антитіло до PD-1 людини за п. 1 або 2, яке містить ланцюг V_H, послідовність якого відповідає SEQ ID NO: 36; і ланцюг V_L, послідовність якого відповідає SEQ ID NO: 42.
4. Антитіло до PD-1 людини за будь-яким з пп. 1-3, яке являє собою IgG.
5. Антитіло до PD-1 людини за будь-яким з пп. 1-4, яке являє собою IgG_1.
6. Антитіло до PD-1 людини за п. 5, яке містить варіантний домен CH2, що має амінокислотні заміни L234A і L235A.
7. Антитіло до PD-1 людини за п. 4, яке являє собою IgG_4.

8. Антитіло до PD-1 людини за п. 7, яке містить варіантну ділянку Fc, що має амінокислотну заміну S228P.

9. Антитіло до PD-1 людини за будь-яким з пп. 1-8, яке містить каппа-легку константну ділянку.

10. Антитіло до PD-1 людини за п. 3, яке містить важкий ланцюг, послідовність якого відповідає SEQ ID NO: 51 або SEQ ID NO: 52, і легкий ланцюг, послідовність якого відповідає SEQ ID NO: 61.

11. Антитіло до PD-1 людини за п. 1, яке являє собою антитіло IgG, яке складається з важких ланцюгів, кожний з яких складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 51, і легких ланцюгів, кожний з яких складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 61.

12. Антитіло до PD-1 людини за п. 1, яке являє собою антитіло IgG, яке складається з важких ланцюгів, кожний з яких складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 52, і легких ланцюгів, кожний з яких складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 61.

13. Фармацевтична композиція, яка містить антитіло до PD-1 людини за будь-яким з пп. 1-12 і фармацевтично прийнятний носій.

14. Нуклеїнова кислота, яка містить нуклеотидну послідовність, що кодує антитіло до PD-1 людини, де антитіло містить (i) ланцюг V_H, що містить три CDR; і (ii) ланцюг V_L, що містить три CDR, де:
CDR № 1 V_H являє собою GYTFTHYGMN (SEQ ID NO: 11);
CDR № 2 V_H являє собою WVNTYTGEPTYADDFKG (SEQ ID NO: 12);
CDR № 3 V_H являє собою EGEGLGFGD (SEQ ID NO: 13);
CDR № 1 V_L являє собою RSSQSIVHSHGDTYLE (SEQ ID NO: 14);
CDR № 2 V_L являє собою KVSNRFS (SEQ ID NO: 15); і
CDR № 3 V_L являє собою FQGSHIPVT (SEQ ID NO: 16).

15. Вектор, який містить нуклеїнову кислоту за п. 14.

16. Еукаріотична клітина-хазяїн, трансформована вектором за п. 15.

17. Еукаріотична клітина-хазяїн, сконструйована для експресії нуклеїнової кислоти за п. 14.

18. Еукаріотична клітина-хазяїн за п. 16 або 17, яка являє собою клітину-хазяїна, одержану від ссавця.

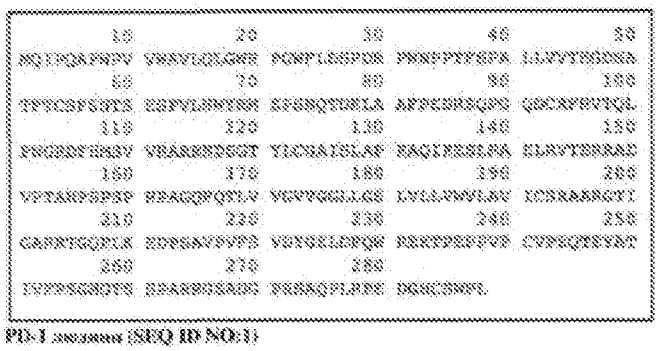
19. Спосіб одержання антитіла до PD-1 людини, який включає: (a) культивування клітини-хазяїна за будь-яким з пп. 16-18 і (b) виділення зв'язувального антитіла до PD-1 людини.

20. Спосіб активації імунної системи, який включає введення пацієнту, що потребує цього, ефективної кількості антитіла до PD-1 людини за будь-яким з пп. 1-12.

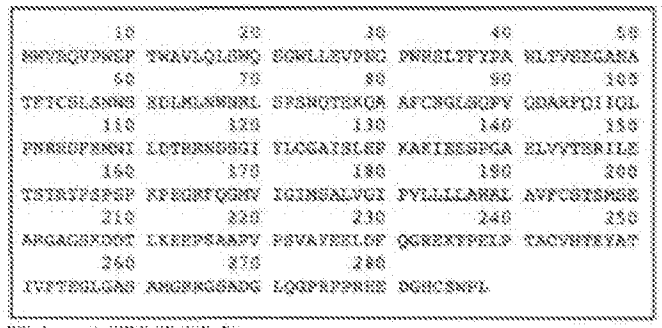
21. Спосіб лікування раку, який включає введення пацієнту, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості антитіла до PD-1 людини, де антитіло містить (i) ланцюг V_H, що містить три CDR; і (ii) ланцюг V_L, що містить три CDR, де:
CDR № 1 V_H являє собою GYTFTHYGMN (SEQ ID NO: 11);
CDR № 2 V_H являє собою WVNTYTGEPTYADDFKG (SEQ ID NO: 12);
CDR № 3 V_H являє собою EGEGLGFGD (SEQ ID NO: 13);
CDR № 1 V_L являє собою RSSQSIVHSHGDTYLE (SEQ ID NO: 14);
CDR № 2 V_L являє собою KVSNRFS (SEQ ID NO: 15); і
CDR № 3 V_L являє собою FQGSHIPVT (SEQ ID NO: 16).

22. Спосіб за п. 21, де рак вибраний з раку сечового міхура, раку молочної залози, раку голови і шиї, раку нирки, раку легені, лімфоми, меланоми або раку шлунка.

23. Спосіб за п. 22, де рак легені являє собою недрібноклітинний рак легені.

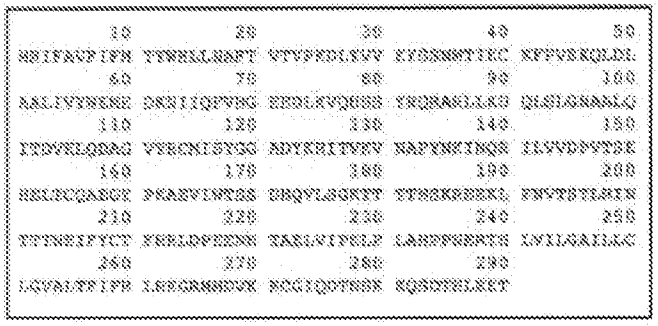


PD-1 людини (SEQ ID NO:1)

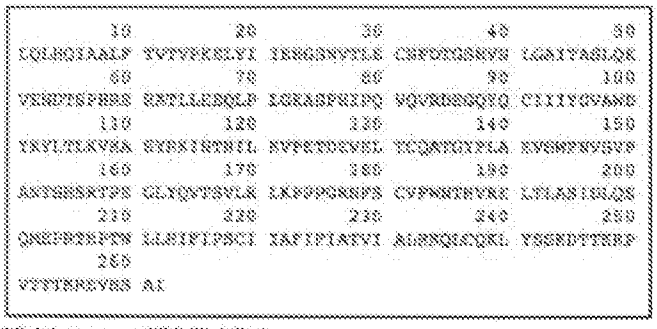


PD-1 миші (SEQ ID NO:2)

Фіг. 1A



PD-L1 людини (SEQ ID NO:3)



PD-L2 людини (SEQ ID NO:4)

Фіг. 1B

Імуногенні послідовності V_H і V_L CD8 зіперечені.

V_H мишачого 12A11 (SEQ ID NO: 31)

EVQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWIN
TYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCTRSGNWDF
DVGQGTTLTVSS

V_L мишачого 12A11 (SEQ ID NO: 41)

DVLMTQIPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKV
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGAGTKLEIK

V_H гуманізованого 12A11.1b (SEQ ID NO: 32)

EVQLVQSGEEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWIN
TYTGEPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTRSGNWDF
DVGQGTTVTVSS

V_L гуманізованого 12A11.1a (SEQ ID NO: 42)

DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKV
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGQGTKLEIK

V_H гуманізованого 12A11.2b (SEQ ID NO: 33)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWIN
TYTGEPTYADDFKGRFTFTLDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSGNWDF
DVGQGTTVTVSS

V_H гуманізованого 12A11.2b з мутацією M99I (SEQ ID NO: 34)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWIN
TYTGEPTYADDFKGRFTFTLDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSGNWDF
DVGQGTTVTVSS

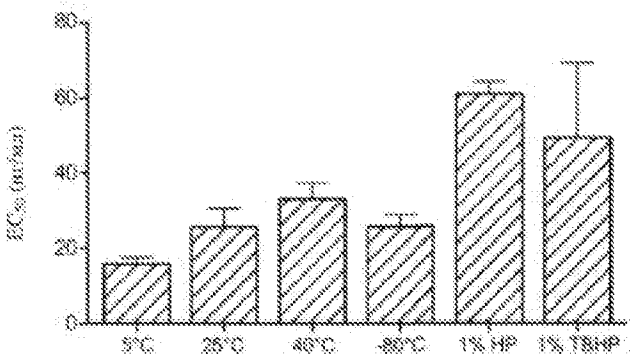
V_H гуманізованого 12A11.2b з мутацією M99V (SEQ ID NO: 35)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWIN
TYTGEPTYADDFKGRFTFTLDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSGNWDF
DVGQGTTVTVSS

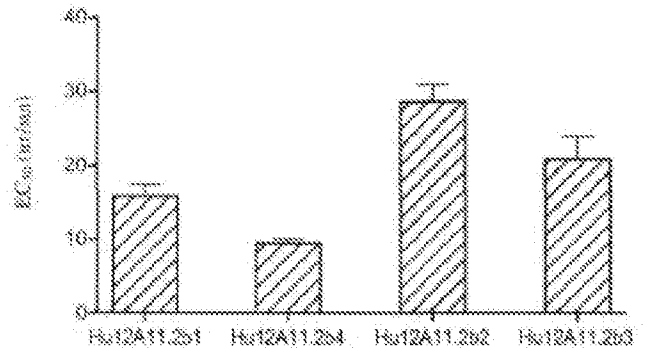
V_H гуманізованого 12A11.2b з мутацією M99L (SEQ ID NO: 36)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWIN
TYTGEPTYADDFKGRFTFTLDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSGNLDF
DVGQGTTVTVSS

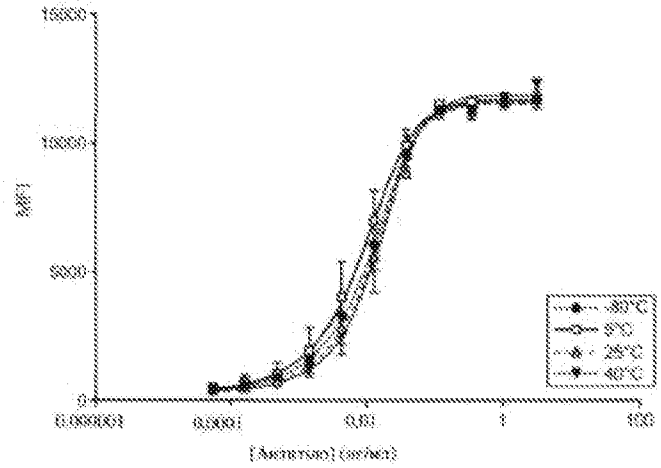
Фіг. 2



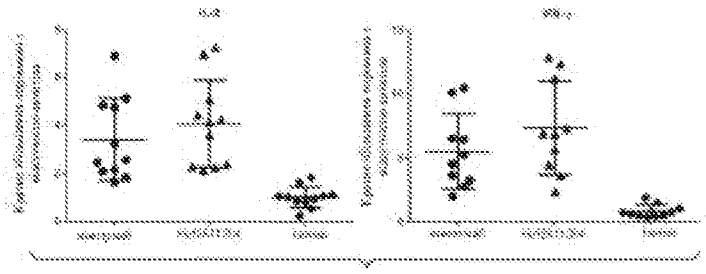
Фіг. 3A



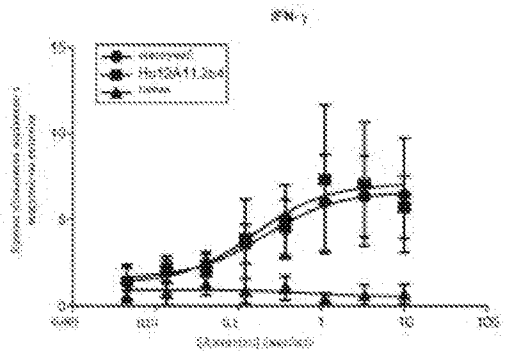
Фіг. 3B



Фіг. 3C



Фіг. 4A



Фіг. 4B

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601