



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122666** (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 ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2016 08946**  
(22) Дата подання заявки: **23.01.2015**  
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **29.12.2020**  
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/930,576, 62/014,181**  
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **23.01.2014, 19.06.2014**  
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US**  
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.01.2017, Бюл.№ 1**  
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **28.12.2020, Бюл.№ 24**  
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2015/012589, 23.01.2015**

(72) Винахідник(и):  
**Пападопулос Ніколас Дж. (US),  
Мерфі Ендрю Дж. (US),  
Терстон Гевін (US),  
Іоффе Елла (US),  
Бурова Елена (US)**  
(73) Володілець (володільці):  
**РИДЖЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ІНК.,  
777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY  
10591, United States of America (US)**  
(74) Представник:  
**Бочаров Максим Анатолійович, реєстр.  
№367**  
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
WO 2006121168 A1, 16.11.2006  
WO 2011110621 A1, 15.09.2011  
WO 2004056875 A1, 08.07.2004  
EP 1591527 A1, 02.11.2005  
Keir Mary et al. Programmed death-1 (PD-1):PD-ligand 1 interactions inhibit TCR-mediated positive selection of thymocytes. The journal of immunology, 2005, vol. 175, no. 11, p. 7372 - 7379  
Riella L. V. et all. Role of the PD-1 pathway in the immune response. American journal of transplantation, 2012, vol. 12, no. 10, p. 2575 - 2587  
Zoran Gatalica et al. Programmed death 1 (PD-1) lymphocytes and ligand (PD-L1) in colorectal cancer and their relationship to microsatellite instability status. Journal clinical oncology, 2014, vol. 32, no. 15s, p. 3625  
DA SILVA R. MOREIRA Anti-PD-1 monoclonal antibody Cancer immunotherapy. Drugs of the future, 2014, vol. 39, no. 1, p. 15 - 24

**(54) ІЗОЛЬОВАНЕ АНТИТІЛО АБО ЙОГО АНТИГЕНЗВ'ЯЗУВАЛЬНИЙ ФРАГМЕНТ, ЩО СПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З ЛЮДСЬКИМ БІЛКОМ ПРОГРАМОВАНОЇ СМЕРТІ-1 (PD-1)**

**(57) Реферат:**

Винахід належить до ізольованого антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, що специфічно зв'язується з людським білком програмованої смерті-1 (PD-1), ізольованої полінуклеотидної молекули, що кодує таке антитіло, вектору, клітини, що експресує даний

**UA 122666 C2**

вектор, способу одержання антитіла. Винахід також належить до фармацевтичної композиції, що містить ізольоване антиігло, застосування ізольованого антитіла або його антигензв'язувального фрагмента або фармацевтичної композиції для інгібування Т-регуляторних (Treg) клітин у суб'єкта, застосування ізольованого антитіла для посилення активації Т-клітин у суб'єкта, застосування антитіла для посилення імунної відповіді та застосування антитіла для інгібування росту пухлини або пухлинних клітин у суб'єкта.

## ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

[001] Даний винахід стосується людських антитіл і антигензв'язувальних фрагментів людських антитіл, що специфічно зв'язуються з імунomodуючим рецептором програмованої смерті-1 (PD-1), і терапевтичних і діагностичних способів застосування цих антитіл.

## 5 СТАН СПОРІДНЕНОЇ ГАЛУЗІ ТЕХНІКИ

[002] Програмована смерть-1 (PD-1) (також має назву CD279) являє собою білковий рецептор з 288 амінокислот, експресований на активованих Т-клітинах і В-клітинах, природних клітинах-кілерах і моноцитах. PD-1 є членом сімейства CD28/CTLA-4 (антигенів цитотоксичних Т-лімфоцитів 4)/ICOS (індукованих костимуляторів) Т-клітинних співінгібуючих рецепторів (Chen et al. 2013, Nat. Rev. Immunol. 13:227-242). Первинною функцією PD-1 є ослаблення імунної відповіді (Riley, 2009, Immunol. Rev. 229:114-125). PD-1 має два ліганди, PD-ліганд-1 (PD-L1) і PD-L2. PD-L1 (CD274, B7H1) інтенсивно експресується як у лімфоїдних, так і нелімфоїдних тканинах, таких як CD4 і CD8 Т-клітини, клітини ліній макрофагів, периферичні тканини, а також у пухлинних клітинах, клітинах, інфікованих вірусами, і клітинах аутоімунних тканин. PD-L2 (CD273, B7-DC) має більш обмежену експресію, ніж PD-L1, будучи експресованим в активованих дендритних клітинах і макрофагах (Dong et al. 1999, Nature Med.). PD-L1 експресується при більшості злоякісних новоутворень людини, що включають меланому, гліому, недрібноклітинний рак легень, плоскоклітинний рак області голови і шиї, лейкемію, рак підшлункової залози, нирковоклітинну карциному і гепатоклітинну карциному, і може індукуватися майже при всіх типах злоякісних новоутворень (Zou and Chen, 2008, Nat. Rev. Immunol. 8:467-77). Зв'язування PD-1 з його лігандами в результаті приводить до зниженої проліферації Т-клітин і секреції цитокінів, порушуючи гуморальні і клітинні імунні відповіді при захворюваннях, таких як злоякісне новоутворення, вірусна інфекція й аутоімунне захворювання. Блокаду зв'язування PD-1 з оборотною імуносупресією досліджували при імунотерапії аутоімунних, вірусних і пухлинних захворювань (Ribas, 2012, NEJM, 366:2517-2519; Watanabe et al. 2012, Clin. Dev. Immunol. Volume 2012, Article ID: 269756; Wang et al. 2013, J. Viral Hep. 20:27-39).

[003] Т-клітинні костимулюючі і співінгібуючі молекули (узагальнено названі косигнальними молекулами) відіграють вирішальну роль у регуляції активації Т-клітин, внутрішньогруповій диференціації, ефекторній функції і виживаності (Chen et al. 2013, Nature Rev. Immunol. 13:227-242). Після розпізнавання когнатних пептид-МНС комплексів на антигенпрезентуючих клітинах Т-клітинними рецепторами, косигнальні рецептори співлокалізуються з Т-клітинними рецепторами в імунному синапсі, де вони синергетично взаємодіють із сигнальним шляхом TCR, щоб ініціювати або інгібувати активацію і функцію Т-клітин (Flies et al. 2011, Yale J. Biol. Med. 84:409-421). Остаточна імунна відповідь регулюється балансом між костимулюючими і співінгібуючими сигналами ("імунними контрольними точками") (Pardoll, 2012, Nature, 12:252-264). PD-1 функціонує як одна така "імунна контрольна точка" при опосередкуванні толерантності периферичних Т-клітин і при запобіганні аутоімунності. PD-1 зв'язується з PD-L1 або PD-L2 і інгібує активацію Т-клітин. Здатність PD-1 інгібувати активацію Т-клітин використовується хронічними вірусними інфекціями і пухлинами, щоб ухилитися від імунної відповіді. При хронічних вірусних інфекціях, PD-1 інтенсивно експресується у вірус-специфічних Т-клітинах, і ці Т-клітини стають "виснаженими" з втратою ефекторних функцій і проліферативної здатності (Freeman, 2008, PNAS, 105:10275-10276). PD-L1 експресується в різноманітних пухлинах, і дослідження на тваринних моделях показали, що PD-L1 у пухлинах інгібує активацію Т-клітин і лізис пухлинних клітин і може приводити до збільшеної смерті пухлиноспецифічних Т-клітин. Система PD-1:PD-L1 також відіграє важливу роль в індукуванні Т-регуляторного (Treg) розвитку клітин і в підтриманні Treg-функції (Francisco et al. 2010, Immunol. Rev. 236:219-242).

[004] Оскільки PD-1 відіграє важливу роль при аутоімунності, імунитеті проти пухлин і імунитеті проти інфекцій, він являє собою ідеальну мішень для імунотерапії. Блокування PD-1 антагоністами, що включають моноклональні антитіла, досліджували при терапіях злоякісних новоутворень і хронічних вірусних інфекцій (Sheridan, 2012, Nature Biotechnol. 30:729-730).

[005] Моноклональні антитіла до PD-1 відомі в даній галузі і були описані, наприклад, у патентних публікаціях США №№ 8008449, 8168757, 20110008369, 20130017199, 20130022595 і в WO 2006121168, WO 20091154335, WO 2012145493, WO 2013014668, WO 2009101611, EP 2262837 і EP 2504028.

## КОРОТКИЙ ЗМІСТ СУТІ ВІНАХОДУ

[006] Даний винахід надає антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти, що зв'язуються з PD-1. Антитіла даного винаходу є застосовними, серед іншого, для цілеспрямованої дії на Т-клітини, експресуючі PD-1, і для модуляції активності PD-1. У деяких варіантах здійснення,

антитіла винаходу є застосовними для інгібування або нейтралізації активності PD-1 і/або для стимуляції активації Т-клітин, наприклад, при обставинах, де опосередковане Т-клітинами знищення є сприятливим або бажаним. В альтернативних варіантах здійснення, антитіла збільшують зв'язування і/або активність PD-1 і можуть застосовуватися для інгібування активації Т-клітин. Антитіла проти PD-1 винаходу або їх антигензв'язувальні частини можуть бути включені як частина мультиспецифічної антигензв'язувальної молекули, наприклад, щоб модулювати імунну відповідь і/або націлювати антитіла на специфічний тип клітин, такий як пухлинна клітина, клітина аутоімунної тканини або клітина, інфікована вірусом. Антитіла є застосовними при лікуванні захворювання або розладу, такого як злоякісне новоутворення, вірусна інфекція й аутоімунне захворювання.

[007] Антитіла винаходу можуть бути непроцесованими (наприклад, антитіло IgG1 або IgG4) або можуть містити тільки антигензв'язувальну частину (наприклад, фрагмент Fab, F(ab')<sub>2</sub> або scFv) і можуть бути модифіковані, щоб впливати на функціональність, наприклад усувати залишкові ефекторні функції (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933). У деяких варіантах здійснення, антитіла можуть бути біспецифічними.

[008] У першому аспекті, даний винахід надає ізольовані рекомбінантні моноклональні антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, що специфічно зв'язуються з PD-1. У деяких варіантах здійснення, антитіла є повністю людськими. Ілюстративні антитіла проти PD-1 даного винаходу перераховані в Таблицях 1-3 цього опису. У Таблиці 1 наведені ідентифікатори амінокислотних послідовностей варіабельних областей важкого ланцюга (HCVRs), варіабельних областей легкого ланцюга (LCVRs), областей, що визначають комплементарність, важкого ланцюга (HCDR1, HCDR2 і HCDR3) і областей, що визначають комплементарність, легкого ланцюга (LCDR1, LCDR2 і LCDR3) ілюстративних антитіл проти PD-1. У Таблиці 2 наведені ідентифікатори послідовностей нуклеїнових кислот HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 і LCDR3 ілюстративних антитіл проти PD-1. У Таблиці 3 наведені ідентифікатори амінокислотних послідовностей послідовностей важкого ланцюга і легкого ланцюга ілюстративних антитіл проти PD-1.

[009] Даний винахід надає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять HCVR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з будь-яких амінокислотних послідовностей HCVR, перерахованих у Таблиці 1, або по суті аналогічну їй послідовність, яка має з нею щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

[010] Даний винахід також надає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять LCVR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з будь-яких амінокислотних послідовностей LCVR, перерахованих у Таблиці 1, або по суті аналогічну їй послідовність, яка має з нею щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

[011] Даний винахід також надає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять пару амінокислотних послідовностей HCVR і LCVR (HCVR/LCVR), що містить будь-яку з амінокислотних послідовностей HCVR, перерахованих у Таблиці 1, у парі будь-якої з амінокислотних послідовностей LCVR, перерахованих у Таблиці 1. Відповідно до деяких варіантів здійснення, даний винахід надає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять пару амінокислотних послідовностей HCVR/LCVR, що міститься в будь-якому з ілюстративних антитіл проти PD-1, перерахованих у Таблиці 1. У деяких варіантах здійснення, пару амінокислотних послідовностей HCVR/LCVR вибирають із групи, що складається з SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/202, 218/202, 226/202, 234/202, 242/202, 250/202, 258/202, 266/202, 274/202, 282/202, 290/202, 298/186, 306/186 і 314/186. У деяких варіантах здійснення, пару амінокислотних послідовностей HCVR/LCVR вибирають з однієї з SEQ ID NO: 130/138 (наприклад, H2M7795N), 162/170 (наприклад, H2M7798N), 234/202 (наприклад, H4xH9048P) або 314/186 (наприклад, H4xH9008P).

[012] Даний винахід також надає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять CDR1 важкого ланцюга (HCDR1), що містить амінокислотну послідовність, вибрану з будь-яких амінокислотних послідовностей HCDR1, перерахованих у Таблиці 1, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

[013] Даний винахід також надає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять CDR2 важкого ланцюга (HCDR2), що містить амінокислотну послідовність, вибрану з будь-яких амінокислотних послідовностей HCDR1, перерахованих у Таблиці 1, або по суті аналогічну їй

послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

[014] Даний винахід також надає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять CDR3 важкого ланцюга (HCDR3), що містить амінокислотну послідовність, вибрану з будь-яких амінокислотних послідовностей HCDR3, перерахованих у Таблиці 1, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

[015] Даний винахід також надає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять CDR1 легкого ланцюга (LCDR1), що містить амінокислотну послідовність, вибрану з будь-яких амінокислотних послідовностей LCDR1, перерахованих у Таблиці 1, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

[016] Даний винахід також надає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять CDR2 легкого ланцюга (LCDR2), що містить амінокислотну послідовність, вибрану з будь-яких амінокислотних послідовностей LCDR2, перерахованих у Таблиці 1, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

[017] Даний винахід також надає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять CDR3 легкого ланцюга (LCDR3), що містить амінокислотну послідовність, вибрану з будь-яких амінокислотних послідовностей LCDR3, перерахованих у Таблиці 1, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

[018] Даний винахід також надає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять пару амінокислотних послідовностей HCDR3 і LCDR3 (HCDR3/LCDR3), що містить будь-яку з амінокислотних послідовностей, перерахованих у Таблиці 1, у парі будь-якої з амінокислотних послідовностей LCDR3, перерахованих у Таблиці 1. Відповідно до деяких варіантів здійснення, даний винахід надає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять пару амінокислотних послідовностей HCDR3/LCDR3, що міститься в будь-якому з ілюстративних антитіл проти PD-1, перерахованих у Таблиці 1. У деяких варіантах здійснення, пару амінокислотних послідовностей HCDR3/LCDR3 вибирають із групи, що складається з SEQ ID NO: 136/144 (наприклад, H2M7795N), 168/176 (наприклад, H2M7798N), 240/208 (наприклад, H4xH9048P) і 320/192 (наприклад, H4xH9008P).

[019] Даний винахід надає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з будь-яких амінокислотних послідовностей HC, перерахованих у Таблиці 3, або по суті аналогічну їй послідовність, що має з нею щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

[020] Даний винахід також надає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з будь-яких амінокислотних послідовностей LC, перерахованих у Таблиці 3, або по суті аналогічну їй послідовність, що має з нею щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

[021] Даний винахід також надає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять пару амінокислотних послідовностей HC і LC (HC/LC), що містить будь-яку з амінокислотних послідовностей HC, перерахованих у Таблиці 3, у парі будь-якої з амінокислотних послідовностей LC, перерахованих у Таблиці 3. Відповідно до деяких варіантів здійснення, даний винахід надає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять пару амінокислотних послідовностей HC/LC, що міститься в будь-якому з ілюстративних антитіл проти PD-1, перерахованих у Таблиці 3. У деяких варіантах здійснення, пару амінокислотних послідовностей HC/LC вибирають із групи, що складається з SEQ ID NO: 330/331, 332/333, 334/335 і 336/337.

[022] Даний винахід також надає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять набір із шести CDR (тобто HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), що міститься в будь-якому з ілюстративних антитіл проти PD-1, перерахованих у Таблиці 1. У деяких варіантах здійснення, набір амінокислотних послідовностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 вибирають із групи, яка складається з SEQ ID NO: 132-134-136-140-142-144 (наприклад, H2M7795N); 164-166-168-172-174-176 (наприклад, H2M7798N); 236-238-240-204-206-208 (наприклад, H4xH9048P) і 316-318-320-188-190-192 (наприклад, H4xH9008P).

[023] У пов'язаному варіанті здійснення, даний винахід надає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять набір із шести CDR (тобто HCDR1-HCDR2-HCDR3-

LCDR1-LCDR2-LCDR3), що міститься в парі амінокислотних послідовностей HCVR/LCVR, визначуваній будь-яким з ілюстративних антитіл проти PD-1, перерахованих у Таблиці 1. Наприклад, даний винахід включає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять набір амінокислотних послідовностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, що

5 міститься в парі амінокислотних послідовностей HCVR/LCVR, вибраній з групи, яка складається з SEQ ID NO: 130/138 (наприклад, H2M7795N); 162/170 (наприклад, H2M7798N); 234/202 (наприклад, H4xH9048P) і 314/186 (наприклад, H4xH9008P). Методи і технології для ідентифікації CDR в амінокислотних послідовностях HCVR і LCVR є добре відомими в даній галузі і можуть застосовуватися для ідентифікації CDR у позначених амінокислотних

10 послідовностях HCVR і/або LCVR, розкритих у даному описі. Ілюстративні домовленості, які можуть застосовуватися для ідентифікації границь CDR, включають, наприклад, визначення Кебат, визначення Чотія і визначення AbM. У цілому, визначення Кебат основане на варіабельності послідовності, визначення Чотія основане на розташуванні структурних петльових областей і визначення AbM є компромісом між підходами Кебат і Чотія. Див., наприклад, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); і Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989). Громадські бази даних також є доступними для ідентифікації послідовностей CDR в антитілі.

[024] Даний винахід включає антитіла проти PD-1, що мають модифіковану схему глікозилювання. У деяких варіантах здійснення, може застосовуватися модифікація для видалення небажаних ділянок глікозилювання або для одержання антитіла без залишку фукози, присутнього в олігосахаридному ланцюзі, наприклад, для збільшення функції антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC) (див. Shield et al. (2002), JBC, 277:26733). В інших застосуваннях, може бути проведена модифікація галактозилювання, щоб модифікувати

25 комплементзалежну цитотоксичність (CDC).

[025] Даний винахід також надає антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти, які конкурують за специфічне зв'язування з PD-1, причому антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить CDR з HCVR і CDR з LCVR, де кожна з HCVR і LCVR має амінокислотну послідовність, вибрану з послідовностей HCVR і LCVR, перерахованих у Таблиці 1.

[026] Даний винахід також надає ізольовані антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти, які блокують зв'язування PD-1 з PD-L1 або PD-L2. У деяких варіантах здійснення, антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що блокує зв'язування PD-1 з PD-L1, може зв'язуватися з таким же епітопом на PD-1, як PD-L1, або може зв'язуватися з епітопом на PD-1, що відрізняється від PD-L1.

[027] В альтернативних варіантах здійснення, даний винахід надає антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти, які стимулюють зв'язування PD-1 з PD-L1. У деяких варіантах здійснення, даний винахід надає ізольовані антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які зв'язуються з PD-1, де антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти підсилюють зв'язування PD-1 з PD-L1. У деяких варіантах здійснення, ізольовані антитіла або їх антигензв'язувальні

40 фрагменти містять CDR з HCVR, де HCVR має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 2, 98 і 250; і CDR з LCVR, де LCVR має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 10, 106 і 202. У деяких варіантах здійснення, ізольовані антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти містять пару амінокислотних послідовностей HCVR/LCVR, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 2/10 (наприклад, H1M7789N), 98/106 (наприклад, H2M7791N) і 250/202 (наприклад, H4H9068P2).

[028] Даний винахід також надає антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти, які специфічно зв'язуються з PD-1 від людини або іншого виду. У деяких варіантах здійснення, антитіла можуть зв'язуватися з PD-1 людини і/або з PD-1 мавпи.

[029] Даний винахід також надає антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти, які перекресно конкурують за зв'язування PD-1 з еталонним антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом, що містить CDR з HCVR і CDR з LCVR, де кожна з HCVR і LCVR має амінокислотну послідовність, вибрану з послідовностей HCVR і LCVR, перерахованих у Таблиці 1.

[030] В одному варіанті здійснення, винахід надає ізольоване антитіло або

55 антигензв'язувальний фрагмент, що має одну або декілька з наступних характеристик: (а) блокує зв'язування PD-1 з PD-L1 або PD-L2; (b) специфічно зв'язується з PD-1 людини і/або PD-1 мавпи; (c) блокує PD-1-індуковану Т-клітинну понижувальну регуляцію й захищає передачу сигналів Т-клітин; (d) пригнічує ріст пухлини і збільшує виживаність у суб'єктів з раком товстої й ободової кишки; (e) інгібує проліферацію Т-клітин в аналітичному тесті зі змішаною реакцією

лімфоцитів (MLR); і (f) збільшує секрецію IL-2 і/або інтерферону гамма в аналітичному тесті MLR.

[031] У деяких варіантах здійснення, антитіло або антигензв'язувальний фрагмент можуть специфічно зв'язуватися з PD-1 агоністичним чином, тобто вони можуть підсилювати або стимулювати зв'язування з PD-1 і/або його активність; в інших варіантах здійснення, антитіло може специфічно зв'язуватися з PD-1 антагоністичним чином, тобто воно може блокувати PD-1 від зв'язування з його лігандом.

[032] У деяких варіантах здійснення, антитіла або антигензв'язувальні фрагменти даного винаходу є біспецифічними і включають першу специфічність зв'язування з PD-1 і другу специфічність зв'язування для другого цільового епітопа. Другий цільовий епітоп може бути ще одним епітопом на PD-1 або на різних білках. У деяких варіантах здійснення, цільовий епітоп може знаходитися на різних клітинах, що включають різні Т-клітини, В-клітини, пухлинні клітини, клітини аутоімунної тканини або клітини, інфіковані вірусом.

[033] В другому аспекті, даний винахід надає молекули нуклеїнової кислоти, кодуєчі антитіла проти PD-1 або їх частини. Наприклад, даний винахід надає молекули нуклеїнової кислоти, кодуєчі будь-яку з амінокислотних послідовностей HCVR, перерахованих у Таблиці 1; у деяких варіантах здійснення молекула нуклеїнової кислоти містить полінуклеотидну послідовність, вибрану з будь-яких послідовностей нуклеїнової кислоти HCVR, перерахованих у Таблиці 2, або по суті аналогічну їй послідовність, що має з нею, щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

[034] Даний винахід також надає молекули нуклеїнової кислоти, кодуєчі будь-яку з амінокислотних послідовностей LCVR, перерахованих у Таблиці 1; у деяких варіантах здійснення молекула нуклеїнової кислоти містить полінуклеотидну послідовність, вибрану з будь-яких послідовностей нуклеїнової кислоти LCVR, перерахованих у Таблиці 2, або по суті аналогічну їй послідовність, що має з нею щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

[035] Даний винахід також надає молекули нуклеїнової кислоти, кодуєчі будь-яку з амінокислотних послідовностей HCDR1, перерахованих у Таблиці 1; у деяких варіантах здійснення молекула нуклеїнової кислоти містить полінуклеотидну послідовність, вибрану з будь-якої послідовності нуклеїнових кислот HCDR1, перерахованих у Таблиці 2, або по суті аналогічну їй послідовність, що має з нею щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

[036] Даний винахід також надає молекули нуклеїнової кислоти, кодуєчі будь-яку з амінокислотних послідовностей HCDR2, перерахованих у Таблиці 1; у деяких варіантах здійснення молекула нуклеїнової кислоти містить полінуклеотидну послідовність, вибрану з будь-якої послідовності нуклеїнових кислот HCDR2, перерахованих у Таблиці 2, або по суті аналогічної їй послідовності, що має з нею щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

[037] Даний винахід також надає молекули нуклеїнової кислоти, кодуєчі будь-яку з амінокислотних послідовностей HCDR3, перерахованих у Таблиці 1; у деяких варіантах здійснення молекула нуклеїнової кислоти містить полінуклеотидну послідовність, вибрану з будь-якої послідовності нуклеїнових кислот HCDR3, перерахованих у Таблиці 2, або по суті аналогічної їй послідовності, що має з нею щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

[038] Даний винахід також надає молекули нуклеїнової кислоти, кодуєчі будь-яку з амінокислотних послідовностей LCDR1, перерахованих у Таблиці 1; у деяких варіантах здійснення молекула нуклеїнової кислоти містить полінуклеотидну послідовність, вибрану з будь-якої послідовності нуклеїнових кислот LCDR1, перерахованих у Таблиці 2, або по суті аналогічної їй послідовності, що має з нею щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

[039] Даний винахід також надає молекули нуклеїнової кислоти, кодуєчі будь-яку з амінокислотних послідовностей LCDR2, перерахованих у Таблиці 1; у деяких варіантах здійснення молекула нуклеїнової кислоти містить полінуклеотидну послідовність, вибрану з будь-якої послідовності нуклеїнових кислот LCDR2, перерахованих у Таблиці 2, або по суті аналогічної їй послідовності, що має з нею щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

[040] Даний винахід також надає молекули нуклеїнової кислоти, кодуєчі будь-яку з амінокислотних послідовностей LCDR3, перерахованих у Таблиці 1; у деяких варіантах здійснення молекула нуклеїнової кислоти містить полінуклеотидну послідовність, вибрану з будь-якої послідовності нуклеїнових кислот LCDR3, перерахованих у Таблиці 2, або по суті

аналогічної їй послідовності, що має з нею щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

[041] Даний винахід також надає молекули нуклеїнової кислоти, кодуєчі HCVR, де HCVR містить набір із трьох CDR (тобто HCDR1-HCDR2-HCDR3), де набір амінокислотних послідовностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 є таким, як визначено будь-яким з ілюстративних антитіл проти PD-1, перерахованих у Таблиці 1.

[042] Даний винахід також надає молекули нуклеїнової кислоти, кодуєчі LCVR, де LCVR містить набір із трьох CDR (тобто LCDR1-LCDR2-LCDR3), де набір амінокислотних послідовностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 є таким, як визначено будь-яким з ілюстративних антитіл проти PD-1, перерахованих у Таблиці 1.

[043] Даний винахід також надає молекули нуклеїнової кислоти, кодуєчі як HCVR, так і LCVR, де HCVR містить амінокислотну послідовність з будь-яких амінокислотних послідовностей HCVR, перерахованих у Таблиці 1, і де LCVR містить амінокислотну послідовність з будь-яких амінокислотних послідовностей LCVR, перерахованих у Таблиці 1. У деяких варіантах здійснення, молекула нуклеїнової кислоти містить полінуклеотидну послідовність, вибрану з будь-якої послідовності нуклеїнових кислот HCVR, перерахованих у Таблиці 2, або по суті аналогічної їй послідовності, що має з нею щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності, і полінуклеотидну послідовність, вибрану з будь-якої послідовності нуклеїнових кислот LCVR, перерахованих у Таблиці 2, або по суті аналогічної їй послідовності, що має з нею щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності. У деяких варіантах здійснення відповідно до цього аспекту винаходу, молекула нуклеїнової кислоти кодує HCVR і LCVR, де як HCVR, так і LCVR одержують з одного і того ж антитіла проти PD-1, наведеного в Таблиці 1.

[044] Даний винахід надає молекули нуклеїнової кислоти, кодуєчі будь-яку з амінокислотних послідовностей важкого ланцюга, перерахованих у Таблиці 3. Даний винахід також надає молекули нуклеїнової кислоти, кодуєчі будь-яку з амінокислотних послідовностей легкого ланцюга, перерахованих у Таблиці 3.

[045] Даний винахід також надає молекули нуклеїнової кислоти, кодуєчі як важкий ланцюг (HC), так і легкий ланцюг (LC), де HC містить амінокислотну послідовність з будь-якої з амінокислотних послідовностей HC, перерахованих у Таблиці 3, і де LC містить амінокислотну послідовність з будь-якої з амінокислотних послідовностей LC, перерахованих у Таблиці 3.

[046] У спорідненому аспекті, даний винахід надає рекомбінантні вектори експресії, здатні до експресії поліпептиду, що містить варіабельну область важкого або легкого ланцюга антитіла проти PD-1. Наприклад, даний винахід включає рекомбінантні вектори експресії, що містять будь-яку з молекул нуклеїнової кислоти, зазначених вище, тобто молекули нуклеїнової кислоти, кодуєчі будь-яку з послідовностей HCVR, LCVR і/або CDR, наведених у Таблиці 1. Даний винахід також надає рекомбінантні вектори експресії, здатні до експресії поліпептиду, що містить важкий або легкий ланцюг антитіла проти PD-1. Наприклад, даний винахід включає рекомбінантні вектори експресії, що містять будь-яку з молекул нуклеїнової кислоти, зазначених вище, тобто молекули нуклеїнової кислоти, кодуєчі будь-яку з послідовностей важкого або ланцюга легкого ланцюга, наведених у Таблиці 3. Також в обсяг даного винаходу включені клітини-хазяїни, у які такі вектори були введені, а також способи продукування антитіл або їх частин за допомогою культивування клітин-хазяїнів при умовах, які забезпечують вироблення антитіл або фрагментів антитіл, і витягання антитіл і фрагментів антитіл, продукованих таким чином.

[047] У третьому аспекті, даний винахід надає мультиспецифічні антигензв'язувальні молекули і їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять першу антигензв'язувальну специфічність, що специфічно зв'язується з PD-1, і другу антигензв'язувальну специфічність, що специфічно зв'язується з антигеном, вибраним із групи, яка складається з пухлинного клітинно-специфічного антигену, тканиноспецифічного антигену аутоімунної тканини, специфічного антигену інфікованої клітини, Т-клітинного співінгібітору, Т-клітинного рецептора, Fc-рецептора, PD-L1 і PD-1. У деяких варіантах здійснення, перша антигензв'язувальна специфічність може містити три CDR, похідні з HCVR з амінокислотною послідовністю, вибраною з послідовностей HCVR у Таблиці 1, і три CDR, похідні з LCVR з амінокислотною послідовністю, вибраною з послідовностей LCVR у Таблиці 1. В одному варіанті здійснення, перша антигензв'язувальна специфічність може містити позаклітинний домен PD-L1. Друга антигензв'язувальна специфічність може цілеспрямовано діяти на антиген у тій же самій клітині, що і для PD-1, або в іншій клітині такого ж типу тканини або іншого типу тканини. Наприклад, мультиспецифічні антигензв'язувальні молекули можуть зв'язуватися з Т-клітиною, де перша антигензв'язувальна



специфічність може специфічно зв'язуватися з PD-1, а друга антигензв'язувальна специфічність може зв'язуватися з Т-клітинним рецептором на Т-клітині. Альтернативно, у ще одному іншому варіанті здійснення, перша антигензв'язувальна специфічність може специфічно зв'язуватися з PD-1 на Т-клітині, а друга антигензв'язувальна специфічність може бути націлена на антиген/рецептор на В-клітині або макрофагу, або антигенпрезентуючій клітині. У деяких варіантах здійснення, друга антигензв'язувальна специфічність може бути спрямована на антиген, асоційований з аутоімунною тканиною. В одному варіанті здійснення, перша антигензв'язувальна специфічність може містити позаклітинний домен PD-L1, а друга антигензв'язувальна специфічність може зв'язуватися з ще одним іншим епітопом на PD-1. У деяких варіантах здійснення, перша антигензв'язувальна специфічність зв'язується з PD-1 з більш низькою афінністю, наприклад з  $K_D$ , більшою ніж  $10^{-7}$  M, більшою ніж  $10^{-6}$  M, більшою ніж  $10^{-5}$  M або більшою ніж  $10^{-4}$  M.

[048] У четвертому аспекті, винахід надає фармацевтичну композицію, яка містить рекомбінантне людське антитіло або його фрагмент, що специфічно зв'язується з PD-1, і фармацевтично прийнятний носій. У спорідненому аспекті, винахід представляє композицію, яка являє собою комбінацію антитіла проти PD-1 і другого терапевтичного засобу. В одному варіанті здійснення, другий терапевтичний засіб являє собою будь-який засіб, який переважно комбінується з антитілом проти PD-1. Ілюстративні засоби, які можуть переважно комбінуватися з антитілом проти PD-1, включають, без обмеження, інші засоби, що зв'язують і/або модулюють сигнальний шлях PD-1 (що включають інші антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти і т. д.) і/або засоби, що не зв'язуються безпосередньо з PD-1, але, проте, модулюють активацію імунних клітин. Додаткові комбінаційні терапії і спільні лікарські форми, які включають антитіла проти PD-1 даного винаходу, розкриті ще в інших розділах цього опису.

[049] У п'ятому аспекті, винахід надає способи модуляції імунної відповіді у суб'єкта, які включають введення терапевтично ефективної кількості антитіла проти PD-1 винаходу або його антигензв'язувального фрагмента суб'єкту, що потребує цього. У деяких варіантах здійснення, винахід надає способи посилення імунної відповіді у суб'єкта, які включають введення суб'єкту ефективної кількості антитіла винаходу або його фрагмента, що зв'язується з PD-1 і блокує зв'язування PD-1 з PD-L1. В одному варіанті здійснення, винахід надає спосіб стимуляції або посилення стимуляції Т-клітин у суб'єкта. В одному варіанті здійснення, винахід надає способи інгібування Т-регуляторних (Treg) клітин у суб'єкта, які включають введення терапевтично ефективної кількості блокуючого антитіла винаходу або його антигензв'язувального фрагмента суб'єкту, що потребує цього. У деяких варіантах здійснення, суб'єкт, що потребує цього, може страждати на захворювання або розлад, такі як злоякісне новоутворення або вірусна інфекція. В альтернативних варіантах здійснення, винахід надає способи інгібування або пригнічення активації Т-клітин у суб'єкта, які включають введення терапевтично ефективної кількості активуючого антитіла винаходу або його фрагмента суб'єкту, що потребує цього. В одному варіанті здійснення, суб'єкт може страждати на аутоімунне захворювання або розлад.

[050] У шостому аспекті, винахід надає терапевтичні способи для лікування захворювання або розладу, такого як злоякісне новоутворення, аутоімунне захворювання або вірусна інфекція, у суб'єкта, з використанням антитіла проти PD-1 або антигензв'язувальної частини антитіла винаходу, де терапевтичні способи включають введення терапевтично ефективної кількості фармацевтичної композиції, яка містить антитіло або фрагмент антитіла винаходу, суб'єкту, що потребує цього. Розлад, який піддається лікуванню, являє собою будь-яке захворювання або стан, що поліпшується, полегшується, інгібується або попереджається за допомогою стимуляції або інгібування активності або сигнального шляху PD-1. У деяких варіантах здійснення, антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент винаходу вводять у комбінації з другим терапевтичним засобом суб'єкту, що потребує цього. Другий терапевтичний засіб може бути вибраний з групи, що складається з антитіла до ще одного іншого Т-клітинного співінгібітору, антитіла до антигену пухлинних клітин, антитіла до Т-клітинного рецептора, антитіла до Fc-рецептора, антитіла до епітопа на клітині, інфікованої вірусом, антитіла до антигену аутоімунної тканини, антитіла до PD-L1, цитотоксичного засобу, засобу проти злоякісного новоутворення, противірусного лікарського засобу, протизапального лікарського засобу (наприклад, кортикостероїдів), хіміотерапевтичного засобу, променевої терапії, імуносупресанту і будь-яких інших лікарських засобів або терапій, відомих у даній галузі. У деяких варіантах здійснення, другий терапевтичний засіб може являти собою засіб, який допомагає протидіяти або знижувати будь-які можливі побічні ефекти, асоційовані з антитілом винаходу або його антигензв'язувальним фрагментом, якщо такі побічні ефекти будуть мати місце.

[051] У деяких варіантах здійснення, даний винахід надає способи пригнічення росту пухлини. У деяких варіантах здійснення, даний винахід надає способи збільшення виживаності пацієнтів зі злоякісним новоутворенням. Приклади злоякісного новоутворення включають, але не обмежуються перерахованим, первинне і/або рецидивуюче злоякісне новоутворення, включаючи рак мозку (наприклад, мультиформну гліобластому), рак легень (наприклад, недрібноклітинний рак легень), плоскоклітинний рак області голови і шиї, нирковоклітинну карциному, меланому, множинну мієлому, рак простати і рак товстої кишки. Способи включають введення фармацевтичної композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість антитіла проти PD-1 даного винаходу в комбінації з другим терапевтичним засобом, вибраним із групи, що складається з антагоніста фактора росту судинного ендотелію (VEGF) (наприклад, афліберцепт, бевацизумаб), інгібітору ангіоектину-2 (Ang2) (наприклад, антитіла проти Ang2, такого як несвакумаб), інгібітору гена активації лімфоцитів 3 (LAG-3), інгібітору антигену цитотоксичних Т-лімфоцитів 4 (CTLA-4) (наприклад, іпілімумаб), хіміотерапевтичного засобу і променевої терапії. Додаткові приклади додаткових терапій/терапевтичних засобів, які можуть застосовуватися в комбінації з антитілом проти PD-1 винаходу для застосування при лікуванні злоякісного новоутворення, описані де-небудь ще в даному описі.

[052] Антитіло або його фрагмент може вводитися підшкірно, внутрішньовенно, внутрішньошкірно, внутрішньоочеревинно, перорально, внутрішньом'язово або інтракраніально. Антитіло або його фрагмент може вводитися при дозі, що дорівнює від приблизно 0,1 мг/кг маси тіла до приблизно 100 мг/кг маси тіла суб'єкта.

[053] Даний винахід також включає застосування антитіла проти PD-1 або його антигензв'язувального фрагмента винаходу у виробництві лікарського засобу для лікування захворювання або розладу, які мали б позитивний ефект від блокади або збільшення зв'язування з PD-1 і/або передачі сигналів.

[054] Інші варіанти здійснення стануть очевидними з огляду подальшого докладного опису.

#### КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

[055] Фіг. 1 являє собою схематичне зображення біотесту на PD-1 на основі люциферази, описаного в Прикладі 8 даного документа. Панель А: неактивні клітини Юркат; Панель В: клітини Юркат активуються Т-клітинним рецептором (TCR), що утворює кластер за допомогою біспецифічного антитіла CD3хCD20; Панель С: активація PD-1 ослабляє відповідь у активованих клітин Юркат; Панель D: блокування PD-1 рятує відповідь у активованих клітин Юркат.

[056] Фіг. 2 ілюструє ріст пухлини і результати по виживаності для мишей з імплантованими пухлинними клітинами Colon-26 на День 0 і мишей, що пройшли лікування зазначеними комбінаціями молекул за допомогою ін'єкції в Дні 3, 6, 10, 13 і 19 ("модель пухлини на ранній стадії"). Графік відображає об'єм пухлини (у мм<sup>3</sup>) для різних експериментальних груп при різних часових оцінках після імплантації. Верхні стрілки уздовж Х-осі вказують на часовий режим лікувальних ін'єкцій. "mIgG2a" являє собою ізотипічний контроль IgG2; "Fc" є людським Fc-контролем; "VEGF-пастка" являє собою афліберцепт; "проти PD-1" являє собою антитіло проти мишачого PD-1 клону RPMI-14; "проти PD-L1" являє собою моноклональне антитіло проти PD-L1, описане в іншому розділі даного опису.

[057] Фіг. 3 ілюструє ріст пухлини і результати по виживаності для мишей з імплантованими пухлинними клітинами Colon-26 на День 0 і мишей, що пройшли лікування зазначеними комбінаціями молекул за допомогою ін'єкції в Дні 3, 6, 10, 13 і 19 ("модель пухлини на ранній стадії"). Графік відображає об'єм пухлини (у мм<sup>3</sup>) індивідуальних мишей у кожній експериментальній групі в День 28 після імплантації. "mIgG2a" являє собою ізотипічний контроль IgG2; "Fc" є людським Fc-контролем; "VEGF-пастка" являє собою афліберцепт; "проти PD-1" являє собою антитіло проти мишачого PD-1 клону RPMI-14; "проти PD-L1" являє собою моноклональне антитіло проти PD-L1, описане в іншому розділі даного опису.

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС

[058] Перед тим, як способи даного винаходу будуть описані, варто розуміти, що даний винахід не обмежений конкретними способами й описаними експериментальними умовами, оскільки такі способи й умови можуть варіювати. Також варто розуміти, що термінологія, використовувана в даному описі, застосовується тільки з метою опису конкретних варіантів здійснення і не має на увазі як обмежувальна, оскільки обсяг даного винаходу буде обмежений тільки прикладеною формулою винаходу.

[059] Якщо не визначено іншим способом, усі технічні і наукові терміни, використовувані в даному описі, мають таке значення, яке звичайно є зрозумілим для рядового фахівця в даній галузі, до якої належить цей винахід. Незважаючи на те, що будь-які способи і матеріали, аналогічні або еквівалентні тим способам і матеріалам, що описані в даному документі і можуть

застосовуватися при практичній реалізації або тестуванні даного винаходу, зараз описані переважні способи і матеріали. Усі публікації, зазначені в даному описі, повністю включені в нього за допомогою посилання.

[060] Термін "PD-1" стосується білка програмованої смерті-1, Т-клітинного співінгібітору, також відомого як CD279. Амінокислотна послідовність непроцесованого PD-1 надана в GenBank під обліковим номером NP\_005009,2 і також називається в даному описі SEQ ID NO: 327. Термін "PD-1" також включає білкові варіанти PD-1, що мають амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 321, 322, 323 або 324. Термін "PD-1" включає рекомбінантний PD-1 або його фрагмент. Термін також охоплює PD-1 або його фрагмент, сумісний, наприклад, з гістидиновою міткою, мишачим або людським Fc або сигнальною послідовністю, такою як ROR1. Наприклад, термін включає послідовності, демонстровані SEQ ID NO: 323 або 324, що містять мишачий Fc (mIgG2a) або людський Fc (hIgG1) по С-кінцю, сумісний з амінокислотними залишками 25-170 непроцесованого PD-1 з C93S-змінюю. Білкові варіанти, як демонструє SEQ ID NO: 321, містять гістидинову мітку по С-кінцю, сумісну з амінокислотними залишками 25-170 непроцесованого PD-1. Якщо не зазначено, що він належить до нелюдського виду, термін "PD-1" означає PD-1 людини.

[061] PD-1 є членом сімейства CD28/CTLA-4/ICOS Т-клітинних співінгібіторів. PD-1 являє собою білок з 288 амінокислот з позаклітинним N-кінцевим доменом, що є IgV-подібним, трансмембранним доменом, і внутрішньоклітинним доменом, що містить імунорецепторний інгібіторний (ITIM) мотив на основі тирозину і імунорецепторний перемикаючий (ITSM) мотив на основі тирозину (Chattopadhyay et al. 2009, Immunol. Rev.). PD-1 рецептор має два ліганди, PD-ліганд-1 (PD-L1) і PD-L2.

[062] Термін "PD-L1" стосується ліганду рецептора PD-1, також відомого як CD274 і B7H1. Амінокислотна послідовність непроцесованого PD-L1 надана в GenBank під обліковим номером NP\_054862,1 і також називається в даному описі як SEQ ID NO: 328. Термін також охоплює PD-L1 або його фрагмент, сумісний, наприклад, з гістидиновою міткою, мишачим або людським Fc або сигнальною послідовністю, такою як ROR1. Наприклад, термін включає послідовності, ілюстровані SEQ ID NO: 325 або 326, що містять мишачий Fc (mIgG2a) або людський Fc (hIgG1) по С-кінцю, сумісний з амінокислотними залишками 19-239 непроцесованого PD-L1. PD-L1 являє собою білок з 290 кислот з позаклітинним IgV-подібним доменом, трансмембранним доменом і у високому ступені консервативним внутрішньоклітинним доменом із приблизно 30 амінокислот. PD-L1 конститутивно експресується в багатьох клітинах, таких як антигенпрезентуючі клітини (наприклад, дендритні клітини, макрофаги і В-клітини) і в гемопоетичних і негемопоетичних клітинах (наприклад, клітинах судинного ендотелію, острівцях Лангерганса і ділянках з імунним привілеєм). PD-L1 також експресується в найрізноманітніших пухлинах, клітинах, інфікованих вірусом, і аутоімунній тканині і є компонентом імуносупресорного середовища (Ribas, 2012, NEJM, 366:2517-2519).

[063] Як використовують у даному описі, термін "Т-клітинний співінгібітор" стосується ліганду і/або рецептора, що модулює імунну відповідь через активацію або супресію Т-клітин. Термін "Т-клітинний співінгібітор", також відомий як Т-клітинна співсигнальна молекула, включає, але не обмежений наведеним, білок гена 3 активації лімфоцитів (LAG-3, також відомий як CD223), цитотоксичний антиген-4 Т-лімфоцитів (CTLA-4) і ослаблювач В- і Т-лімфоцитів (BTLA), CD-28, 2B4, LY108, Т-клітинний імуноглобулін і муцин 3 (TIM3), Т-клітинний імунорецептор з імуноглобуліном і ITIM (TIGIT; також відомий як VSIG9), асоційований з лейкоцитами імуноглобуліноподібний рецептор 1 (LAIR1; також відомий як CD305), індукований Т-клітинний коstimулятор (ICOS; також відомий як CD278), V-домен Ig супресора активації Т-клітин (VISTA) і CD160.

[064] Як використовують у даному описі, термін "Fc-рецептор" стосується білка поверхневого рецептора, виявлюваного на імунних клітинах, що включають В-лімфоцити, природні клітини-кілери, макрофаги, базофіли, нейтрофіли і тучні клітини, який має специфічність зв'язування з Fc-областю антитіла. Термін "Fc-рецептор" включає, але не обмежений наведеним, Fcγ-рецептор [наприклад, FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIB (CD32), FcγRIIIA (CD16a) і FcγRIIIB (CD16b)], Fcα-рецептор (наприклад, FcαRI або CD89) і Fcε-рецептор [наприклад, FcεRI і FcεRII (CD23)].

[065] Термін "антитіло", як використовують у даному описі, призначений для позначення імуноглобулінових молекул, складених з чотирьох поліпептидних ланцюгів, двох важких (H) ланцюгів і двох легких (L) ланцюгів, взаємозв'язаних дисульфідними зв'язками (тобто "повних молекул антитіл"), а також їх мультимерів (наприклад, IgM) або їх антигензв'язувальних фрагментів. Кожен важкий ланцюг складений з варіабельної області важкого ланцюга ("HCVR" або "V<sub>H</sub>") і константної області важкого ланцюга (що складається з доменів C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> і C<sub>H3</sub>).

Кожен легкий ланцюг складений з варіабельної області легкого ланцюга ("LCVR" або "V<sub>L</sub>") і константної області легкого ланцюга (C<sub>L</sub>). Області V<sub>H</sub> і V<sub>L</sub> можуть бути додатково підрозділені на області гіперваріабельності, названі областями, що визначають комплементарність (CDR), які перемижуються з областями, що є більш консервативні, названими каркасні області (FR).

5 Кожна V<sub>H</sub> і V<sub>L</sub> складається з трьох CDR і чотирьох FR, розташованих від амінокінця до карбоксикінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. У деяких варіантах здійснення винаходу, FR антитіла (або антигензв'язувального фрагмента) можуть бути ідентичними людським ембріональним послідовностям або можуть бути природним чином або штучно модифіковані. Амінокислотна консенсусна послідовність може бути визначена на

10 основі порівняльного аналізу двох або більше CDR.

[066] Заміна одного або декількох залишків CDR або пропуск однієї або декількох CDR також є можливими. У науковій літературі були описані антитіла, у яких одна або дві CDR можуть обходитися без зв'язування. Padlan et al. (1995, FASEB J. 9:133-139) аналізували контактні області між антитілами і їх антигенами, на основі опублікованих кристалічних структур,

15 і зробили висновок, що тільки приблизно від однієї п'ятої до однієї третьої залишків CDR у дійсності контактують з антигеном. Padlan також знайшов багато антитіл, у яких одна або дві CDR не мали амінокислот у контакті з антигеном (див. також, Vajdos et al. 2002, J. Mol. Biol. 320:415-428).

[067] Залишки CDR, що не контактують з антигеном, можуть бути ідентифіковані на основі попередніх досліджень (наприклад, залишки H60-H65 у CDRH2 часто не потрібні), з областей CDR по Кебат, що лежать поза CDR по Чотія, за допомогою молекулярного моделювання і/або емпірично. Якщо CDR або її залишок (залишки) пропущений(і), вона звичайно замінюється на амінокислоту, що займає відповідне положення в ще одній послідовності людського антитіла або консенсусі таких послідовностей. Положення для заміни усередині CDR і амінокислоти для

20 заміни також можуть бути вибрані емпірично. Емпіричні заміни можуть бути консервативними або неконсервативними замінами.

[068] Повністю людські моноклональні антитіла проти PD-1, розкриті в даному описі, можуть містити одну або декілька амінокислотних замін, вставок і/або делецій у каркасній області і/або варіабельних доменах CDR областей важкого і легкого ланцюгів в порівнянні з відповідними ембріональними послідовностями. Такі мутації можуть бути легко встановлені за допомогою порівняння амінокислотних послідовностей, розкритих у даному описі, з ембріональними послідовностями, доступними з, наприклад, загальнодоступних баз даних послідовностей антитіл. Даний винахід включає антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти, які є похідними від будь-якої з амінокислотних послідовностей, розкритих у даному описі, де одна або декілька

30 амінокислот усередині однієї або декількох каркасних і/або CDR-областей піддаються мутації до відповідного залишку (залишків) ембріональної послідовності, з якої антитіло було одержано, або до відповідного залишку (залишків) ще однієї людської ембріональної послідовності, або до заміни консервативної амінокислоти із відповідного ембріонального залишку (залишків) (такі зміни послідовності іменуються в даному описі як "ембріональні мутації"). Рядовий фахівець у даній галузі, починаючи з послідовностей варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів, розкритих у даному описі, зможе легко одержати численні антитіла й антигензв'язувальні фрагменти, які містять одну або декілька індивідуальних ембріональних мутацій або їх комбінації. У деяких варіантах здійснення, усі з каркасних і/або CDR-залишків у доменах V<sub>H</sub> і/або V<sub>L</sub> піддаються зворотній мутації до залишків, що виявляються у вихідній ембріональній

40 послідовності, з якої антитіло було одержане. В інших варіантах здійснення, тільки деякі залишки мутують зворотно до вихідної ембріональної послідовності, наприклад тільки залишки, що мутували, виявлені в межах перших 8 амінокислот з FR1 або в межах останніх 8 амінокислот FR4, або тільки залишки, що мутували, виявлені в межах CDR1, CDR2 або CDR3. В інших варіантах здійснення, один або декілька з каркасних і/або CDR-залишків мутують у відповідні

45 залишки відмінної ембріональної послідовності (тобто ембріональної послідовності, що відрізняється від ембріональної послідовності, з якої антитіло було спочатку одержане). Крім того, антитіла даного винаходу можуть містити будь-яку комбінацію з двох або декількох ембріональних мутацій у межах каркасної і/або CDR-області, наприклад, де деякі індивідуальні залишки мутують у відповідний залишок конкретної ембріональної послідовності, у той час як

50 деякі інші залишки, що відрізняються від вихідної ембріональної послідовності, підтримуються або мутують у відповідний залишок іншої ембріональної послідовності. Відразу після одержання, антитіла й антигензв'язувальні фрагменти, які містять одну або декілька ембріональних мутацій, можуть бути легко протестовані на одну або декілька бажаних властивостей, таких як поліпшена специфічність зв'язування, збільшена афінність зв'язування,

55 поліпшені або посилені антагоністичні або агоністичні біологічні властивості (у деяких випадках),

60

знижена імуногенність і т. д. Антитіла й антигензв'язувальні фрагменти, одержані таким загальним способом, охоплюються даним винаходом.

[069] Даний винахід також включає повністю людські моноклональні антитіла проти PD-1, які містять варіанти будь-яких з амінокислотних послідовностей HCVR, LCVR і/або CDR, розкритих тут, що мають одну або декілька консервативних замінів. Наприклад, даний винахід включає антитіла проти PD-1, що мають амінокислотні послідовності HCVR, LCVR і/або CDR з, наприклад, 10 або менше, 8 або менше, 6 або менше, 4 або менше і т. д. консервативних амінокислотних замінів відносно будь-яких з амінокислотних послідовностей HCVR, LCVR і/або CDR, розкритих тут.

[070] Термін "людське антитіло", як використовують у даному описі, має на увазі включення антитіл, які мають варіабельні і константні області, одержані з людських ембріональних послідовностей імуноглобулінів. Людські mAb винаходу можуть включати амінокислотні залишки, неcodовані людськими ембріональними послідовностями імуноглобулінів (наприклад, мутації, що вводяться за допомогою випадкового або сайт-специфічного мутагенезу *in vitro* або за допомогою соматичної мутації *in vivo*), наприклад, у CDR і, конкретно, у CDR3. Однак, термін "людське антитіло", як використовують у даному описі, не призначений для включення mAb, у яких послідовності CDR, одержані з ембріональної лінії ще одного виду ссавця (наприклад, миші), були щеплені на людські послідовності FR. Термін включає антитіла, рекомбінантно одержані в ссавці, що не є людиною, або в клітинах ссавця, що не є людиною. Термін не призначений для включення антитіл, ізольованих з людського суб'єкта або генерованих у ньому.

[071] Термін "рекомбінантне", як використовують у даному описі, стосується антитіл або їх антигензв'язувальних фрагментів винаходу, створених, експресованих, ізольованих або одержаних за допомогою технологій або способів, відомих в даній галузі, таких як технологія рекомбінантних ДНК, що включає, наприклад, сплайсинг ДНК і трансгенну експресію. Термін стосується антитіл, експресованих у ссавця, що не є людиною (що включає трансгенних нелюдських ссавців, наприклад трансгенних мишей), або клітинній (наприклад, у клітинах CHO) системі експресії, або ізольованих з комбінаторної бібліотеки рекомбінантних людських антитіл.

[072] Термін "мультиспецифічні антигензв'язувальні молекули", як використовують у даному описі, стосується біспецифічних, триспецифічних або мультиспецифічних антигензв'язувальних молекул і їх антигензв'язувальних фрагментів. Мультиспецифічні антигензв'язувальні молекули можуть бути специфічними для різних епітопів одного цільового поліпептиду або можуть містити антигензв'язувальні домени, специфічні для епітопів більше ніж одного цільового поліпептиду. Мультиспецифічна антигензв'язувальна молекула може являти собою одиночний мультифункціональний поліпептид або вона може бути мултимерним комплексом із двох або більше поліпептидів, які ковалентно або нековалентно асоційовані один з одним. Термін "мультиспецифічні антигензв'язувальні молекули" включає антитіла даного винаходу, які можуть бути зв'язані або спільно експресуватися з ще однією функціональною молекулою, наприклад ще одним пептидом або білком. Наприклад, антитіло або його фрагмент можуть бути функціонально зв'язані (наприклад, за допомогою хімічного сполучення, генетичної гібридизації, нековалентної асоціації або інакше) з одним або декількома іншими молекулярними об'єктами, такими як білок або його фрагмент, для одержання біспецифічної або мультиспецифічної антигензв'язувальної молекули з другою специфічністю зв'язування. Відповідно до даного винаходу, термін "мультиспецифічні антигензв'язувальні молекули" також включає біспецифічні, триспецифічні або мультиспецифічні антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти. У деяких варіантах здійснення, антитіло даного винаходу є функціонально зв'язаним із ще одним антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом для одержання біспецифічного антитіла з другою специфічністю зв'язування. Біспецифічні і мультиспецифічні антитіла даного винаходу описані в інших розділах цього опису.

[073] Терміни "специфічно зв'язується" або "специфічно зв'язується з", або т. п. означають, що антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент утворює комплекс з антигеном, який є відносно стабільним при фізіологічних умовах. Специфічне зв'язування може характеризуватися рівноважною константою дисоціації, що дорівнює щонайменше приблизно  $1 \times 10^{-8}$  М або менше (наприклад, більш низька  $K_D$  означає більш щільне зв'язування). Методи визначення того, чи зв'язуються специфічно дві молекули, добре відомі в даній галузі і включають, наприклад, рівноважний діаліз, поверхневий плазмонний резонанс і т. п. Як описано тут, антитіла ідентифікували за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, наприклад BIACORE™, що зв'язується специфічно з PD-1. Більше того, мультиспецифічні антитіла, що зв'язуються з одним доменом у PD-1 і одним або декількома додатковими антигенами, або біспецифічна молекула, що зв'язується з двома різними областями PD-1, проте, вважаються антитілами, які "специфічно зв'язуються", як використовують у даному описі.

[074] Термін "висока афінність" антитіла стосується mAb, які мають афінність зв'язування з PD-1, що виражається як  $K_D$ , що дорівнює щонайменше  $10^{-7}$  М, переважно  $10^{-8}$  М, більш переважно  $10^{-9}$  М, навіть більш переважно  $10^{-10}$  М, навіть більш переважно  $10^{-11}$  М, як виміряно за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, наприклад BIACORE™ або ELISA з афінністю в розчині.

[075] Терміни "швидкість уповільнення", " $K_{off}$ " або " $k_d$ " означають, що антитіло дисоціює з PD-1 з константою швидкості, що дорівнює  $1 \times 10^{-3}$  с<sup>-1</sup> або менше, переважно  $1 \times 10^{-4}$  с<sup>-1</sup> або менше, як визначають поверхневим плазмонним резонансом, наприклад BIACORE™.

[076] Терміни "антигензв'язувальна частина" антитіла, "антигензв'язувальний фрагмент" антитіла і т. п., як використовують у даному описі, включають будь-який природний, ферментативно одержуваний, синтетичний або генетично сконструйований поліпептид або глікопротеїн, що специфічно зв'язується з антигеном з утворенням комплексу. Терміни "антигензв'язувальний фрагмент" антитіла або "фрагмент антитіла", як використовують у даному описі, стосується одного або декількох фрагментів антитіла, які зберігають здатність зв'язуватися з PD-1.

[077] У конкретних варіантах здійснення, антитіло або фрагмент антитіла винаходу можуть бути кон'юговані із фрагментом, таким як ліганд або терапевтичний фрагмент ("імунокон'югат"), такий як антибіотик, друге антитіло проти PD-1 або антитіло до ще одного антигену, такого як пухлиноспецифічний антиген, антиген аутоімунної тканини, антиген клітини, інфікованої вірусом, Fc-рецептор, Т-клітинний рецептор або Т-клітинний співінгібітор, або імунотоксин, або будь-який терапевтичний фрагмент, застосовуваний для лікування захворювання або стану, що включає злоякісне новоутворення, аутоімунне захворювання або хронічну вірусну інфекцію.

[078] "Ізольоване антитіло", як використовують у даному описі, призначене для позначення антитіла, яке не містить по суті інших антитіл (Ab), що мають різні антигенні специфічності (наприклад, ізольоване антитіло, що специфічно зв'язується з PD-1, або його фрагмент по суті не містить Ab, які специфічно зв'язують антигени, відмінні від PD-1).

[079] "Блокуюче антитіло" або "нейтралізуюче антитіло", як використовують у даному описі (або "антитіло, що нейтралізує активність PD-1", або "антагоністичне антитіло"), призначене для позначення антитіла, зв'язування якого з PD-1 приводить до інгібування щонайменше однієї біологічної активності PD-1. Наприклад, антитіло винаходу може запобігати або блокувати зв'язування PD-1 з PD-L1.

[080] "Активуюче антитіло" або "посилюче антитіло", як використовують у даному описі (або "агоністичне антитіло"), призначене для позначення антитіла, зв'язування якого з PD-1 приводить до збільшення або стимуляції щонайменше однієї біологічної активності PD-1. Наприклад, антитіло винаходу може збільшувати зв'язування PD-1 з PD-L1.

[081] Термін "поверхневий плазмонний резонанс", як використовують у даному описі, стосується оптичного явища, яке робить можливим дослідження біомолекулярних взаємодій у режимі реального часу за допомогою виявлення змін концентрацій білка в матриці біосенсора, наприклад, використовуючи систему BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden і Piscataway, N.J.).

[082] Термін " $K_D$ ", як використовують у даному описі, призначений для позначення рівноважної константи дисоціації конкретної взаємодії антитіло-антиген.

[083] Термін "епітоп" стосується антигенної детермінанти, що взаємодіє з конкретною ділянкою зв'язування антигену у варіабельній області молекули антитіла, відомою як паратоп. Одиночний антиген може мати більше ніж один епітоп. Таким чином, різні антитіла можуть зв'язуватися з різними областями на антигені і можуть мати різні біологічні ефекти. Термін "епітоп" також стосується ділянки на антигені, на яку реагують В- і/або Т-клітини. Він також стосується області антигену, що зв'язується антитілом. Епітопи можуть бути визначені як структурні або функціональні. Функціональні епітопи звичайно являють собою підвид структурних епітопів і мають такі залишки, що безпосередньо сприяють афінності взаємодії. Епітопи можуть також бути конформаційними, тобто складатися з нелінійних амінокислот. У деяких варіантах здійснення, епітопи можуть включати детермінанти, що є хімічно активними поверхневими угрупованнями молекул, таких як амінокислоти, цукрові бічні ланцюги, фосфорильні групи або сульфонільні групи, і, у деяких варіантах здійснення, можуть мати специфічні тривимірні структурні характеристики і/або специфічні характеристики заряду.

[084] Термін "суттєва ідентичність" або "по суті ідентичні", коли відносять до нуклеїнової кислоти або її фрагмента, указує на те, що при оптимальному вирівнюванні з відповідними нуклеотидними вставками або делеціями з ще однією нуклеїновою кислотою (або її комплементарним ланцюгом) існує нуклеотидна ідентичність послідовності на щонайменше приблизно 90 % і більш переважно щонайменше приблизно 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %

нуклеотидних основ, виміряна за допомогою будь-якого добре відомого алгоритму ідентичності послідовності, такого як FASTA, BLAST або GAP, як обговорюється нижче. Молекула нуклеїнової кислоти, яка має суттєву ідентичність з еталонною молекулою нуклеїнової кислоти, може, у деяких випадках, кодувати поліпептид, що має таку ж або по суті аналогічну амінокислотну послідовність, як поліпептид, кодований еталонною молекулою нуклеїнової кислоти.

[085] Застосовно до поліпептидів, термін "суттєва подібність" або "по суті аналогічна" означає, що дві пептидних послідовності, при оптимальному вирівнюванні, такому як за допомогою програм GAP або BESTFIT з використанням геп-мас за замовчуванням, розділяють щонайменше 90 % ідентичності послідовності, навіть більш переважно щонайменше 95 %, 98 % або 99 % ідентичності послідовності. Переважно, положення залишків, що не є ідентичними, відрізняються консервативними замінами амінокислот. "Консервативна заміна амінокислоти" є заміною, при якій амінокислотний залишок замінюється ще одним амінокислотним залишком, що має бічний ланцюг (R-групу) з аналогічними хімічними властивостями (наприклад, зарядом або гідрофобністю). У цілому, консервативна амінокислотна заміна не буде суттєво змінювати функціональні властивості білка. У випадках, де дві або декілька амінокислотних послідовностей відрізняються одна від одної консервативними замінами, відсоток або ступінь подібності може регулюватися з підвищенням для корекції консервативної природи заміни. Засоби проведення таких регулювань добре відомі фахівцям в даній галузі. Див., наприклад, Pearson (1994), *Methods Mol. Biol.* 24:307-331, що включена в даний опис за допомогою посилання. Приклади груп амінокислот, які мають бічні ланцюги з подібними хімічними властивостями, включають 1) аліфатичні бічні ланцюги: гліцин, аланін, валін, лейцин і ізолейцин; 2) аліфатичні-гідроксильні бічні ланцюги: серин і треонін; 3) амідовмісні бічні ланцюги: аспарагін і глутамін; 4) ароматичні бічні ланцюги: фенілаланін, тирозин і триптофан; 5) основні бічні ланцюги: лізин, аргінін і гістидин; 6) кислі бічні ланцюги: аспартат і глутамат; і 7) сірковмісні бічні ланцюги: цистеїн і метіонін. Переважними консервативними амінокислотними замінюючими групами є: валін-лейцин-ізолейцин, фенілаланін-тирозин, лізин-аргінін, аланін-валін, глутамат-аспартат і аспарагін-глутамін. Альтернативно, консервативна заміна являє собою будь-яку зміну, що має позитивне значення в матриці лог-подібності PAM250, розкритий в Gonnet et al. (1992), *Science*, 256:1443-45, включений тут за допомогою посилання. "Помірно консервативна" заміна являє собою будь-яку зміну, що має ненегативне значення в матриці лог-подібності PAM250.

[086] Подібність послідовностей для поліпептидів звичайно вимірюють, використовуючи програмне забезпечення аналізу послідовностей. Програмне забезпечення аналізу білка суміщає подібні послідовності з використанням вимірювань подібності, що належить до різних замін, делецій і інших модифікацій, які включають консервативні амінокислотні заміни. Наприклад, програмне забезпечення GCG містить програми, такі як GAP і BESTFIT, що можуть застосовуватися з параметрами за замовчуванням для визначення гомології послідовностей або ідентичності послідовностей між близькоспорідненими поліпептидами, такими як гомологічні поліпептиди від організмів різних видів або між білком дикого типу і його мутантом. Див., наприклад, GCG Version 6.1. Поліпептидні послідовності також можуть порівнюватися з використанням FASTA з параметрами за замовчуванням або рекомендованими параметрами; програма в GCG Version 6.1. FASTA (наприклад, FASTA2 і FASTA3) надає вирівнювання і відсоток ідентичності послідовностей областей найкращого перекривання між запитуваною і пошуковою послідовностями (Pearson (2000), вище). Ще одним переважним алгоритмом при порівнянні послідовності винаходу з базою даних, що містить велике число послідовностей від різних організмів, є комп'ютерна програма BLAST, особливо BLASTP або TBLASTN, з використанням параметрів за замовчуванням. Див., наприклад, Altschul et al. (1990), *J. Mol. Biol.* 215:403-410; і (1997), *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, кожна з яких включена в даний опис за допомогою посилання.

[087] Фраза "терапевтично ефективна кількість" означає кількість, яка надає бажаний ефект, для якого її вводять. Точна кількість буде залежати від мети лікування і буде установлюватися фахівцем в даній галузі з використанням відомих методів (див., наприклад, Lloyd (1999), *Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

[088] Як використовують у даному описі, термін "суб'єкт" стосується тварини, переважно ссавця, що потребує зниження, запобігання і/або лікування захворювання або розладу, такого як хронічна вірусна інфекція, злоякісне новоутворення або аутоімунне захворювання.

[089] Як використовують у даному описі, "протипухлинний засіб" означає будь-який засіб, застосовний для лікування злоякісного новоутворення, який включає, але не обмежений перерахованим, цитотоксини і засоби, такі як антиметаболіти, алкілувальні засоби,

антрацикліни, антибіотики, антимітотичні засоби, прокарбазин, гідроксисечовину, аспарагіназу, кортикостероїди, мітотан (O,P'-(DDD)), біологічні засоби (наприклад, антитіла й інтерферони) і радіоактивні речовини. Як використовують у даному описі, "цитотоксин або цитотоксичний засіб" також стосується хімотерапевтичного засобу й означає будь-який засіб, що надає на клітини шкідливий вплив. Приклади включають Taxol® (паклітаксел), темозоломід, цитохалазин В, граміцидин D, бромід етидію, еметин, цисплатин, мітоміцин, етопозид, теніпозид, вінкристин, вінбластин, колхіцин, доксорубіцин, даунорубіцин, дигідроксіантрациндіон, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, тетракаїн, лідокаїн, пропранолол і пуроміцин і їх аналоги або гомологи.

[090] Як використовують у даному описі, термін "противірусний засіб" стосується будь-якого лікарського засобу або терапії, що застосовується для лікування, запобігання або зменшення вірусної інфекції у суб'єкта-хазяїна. Термін "противірусний засіб" включає, але не обмежений наведеним, зидовудин, ламівудин, абакавір, рибавірин, лопінавір, ефавіренц, кобіцистат, тенофовір, рилпівірин, анальгетики і кортикостероїди. У контексті даного винаходу, вірусні інфекції включають довгострокові або хронічні інфекції, що викликаються вірусами, які включають, але не обмежені наведеним, вірус імунодефіциту людини (ВІЛ), вірус гепатиту В (HBV), вірус гепатиту С (HCV), вірус папіломи людини (HPV), вірус лімфоцитарного хориомеїнігиту (LCMV) і вірус імунодефіциту мавпи (SIV).

[091] Антитіла й антигензв'язувальні фрагменти даного винаходу специфічно зв'язуються з PD-1 і модулюють взаємодію PD-1 з PD-L1. Антитіла проти PD-1 можуть зв'язуватися з PD-1 з високою афінністю або з низькою афінністю. У деяких варіантах здійснення, антитіла даного винаходу можуть бути блокуючими антитілами, де антитіла можуть зв'язуватися з PD-1 і блокувати взаємодію PD-1 з PD-L1. У деяких варіантах здійснення, блокуючі антитіла винаходу можуть блокувати зв'язування PD-1 з PD-L1 і/або стимулювати або підсилювати активацію Т-клітин. У деяких варіантах здійснення, блокуючі антитіла можуть застосовуватися для стимуляції або посилення імунної відповіді і/або для лікування суб'єкта, що страждає на злоякісне новоутворення або хронічну вірусну інфекцію. Антитіла при введенні суб'єкту, що потребує цього, можуть знижувати хронічну інфекцію, що викликається вірусом, таким як HIV, LCMV або HBV, у суб'єкта. Вони можуть застосовуватися для інгібування росту пухлинних клітин у суб'єкта. Вони можуть застосовуватися окремо або як допоміжна терапія з іншими терапевтичними фрагментами або модальностями, відомими в даній галузі, для лікування злоякісного новоутворення або вірусної інфекції.

[092] В інших варіантах здійснення, антитіла даного винаходу можуть являти собою активуючі антитіла, де антитіла можуть зв'язуватися з PD-1 і підсилювати взаємодію PD-1 і PD-L1. У деяких варіантах здійснення, активуючі антитіла можуть підсилювати зв'язування PD-1 з PD-L1 і/або інгібувати або пригнічувати активацію Т-клітин. Активуючі антитіла даного винаходу можуть бути застосованими для інгібування імунної відповіді у суб'єкта і/або для лікування аутоімунного захворювання.

[093] У деяких варіантах здійснення, антитіла проти PD-1 можуть являти собою мультиспецифічні антигензв'язувальні молекули, де вони містять першу специфічність зв'язування з PD-1 і другу специфічність зв'язування з антигеном, вибраним із групи, що складається з ще одного Т-клітинного співінгібітору, антигену аутоімунної тканини, Т-клітинного рецептора, Fc-рецептора, Т-клітинного рецептора, PD-L1 і іншого епітопа з PD-1.

[094] У деяких варіантах здійснення, антитіла винаходу одержують з мишей, імунізованих первинним імуногеном, таким як непроцесований PD-1 [див. GenBank, обліковий номер NP\_005009.2 (SEQ ID NO: 327)], або рекомбінантною формою PD-1, або модифікованими фрагментами PD-1 людини (SEQ ID NO: 321, 323 або 324), або модифікованими фрагментами PD-1 мавпи (SEQ ID NO: 322), з наступною імунізацією вторинним імуногеном або імуногенно активним фрагментом PD-1.

[095] Імуноген може являти собою біологічно активний і/або імуногенний фрагмент PD-1 або ДНК, кодуючу його активний фрагмент. Фрагмент може бути одержаний з N-кінцевого або C-кінцевого домену PD-1. У деяких варіантах здійснення винаходу, імуноген є фрагментом PD-1, що знаходиться в інтервалі амінокислотних залишків 25-170 з SEQ ID NO: 327 зі зміною C93S.

[096] Пептиди можуть бути модифіковані для включення або приєднання заміни деяких залишків для мічення або для цілей кон'югації з молекулами-носіями, такими як KLH. Наприклад, цистеїн може бути приєднаний або по N-термінальному, або по C-термінальному кінцю пептиду або лінкерна послідовність може бути додана для одержання пептиду для кон'югації, наприклад, з KLH для імунізації.

[097] Непроцесована амінокислотна послідовність непроцесованого PD-1 людини показана як SEQ ID NO: 327.



[098] У деяких варіантах здійснення, антитіла, які специфічно зв'язуються з PD-1, можуть бути одержані з використанням фрагментів зазначених вище областей або пептидів, що знаходяться поза позначеними областями на приблизно 5-20 амінокислотних залишків від кожного з, або обох, N- або C- термінальних кінців областей, описаних тут. У деяких варіантах здійснення, будь-яка комбінація зазначених вище областей або їх фрагментів може застосовуватися при одержанні PD-1-специфічних антитіл. У деяких варіантах здійснення, будь-які одна або декілька з зазначених вище областей PD-1 або їх фрагментів можуть застосовуватися для одержання моноспецифічних, біспецифічних або мультиспецифічних антитіл.

[099] Деякі антитіла проти PD-1 даного винаходу здатні зв'язуватися з PD-1 і нейтралізувати його активність, як визначають за допомогою тестів *in vitro* або *in vivo*. Здатність антитіл винаходу зв'язуватися з PD-1 і нейтралізувати його активність може бути виміряна з використанням будь-яких стандартних методів, відомих фахівцям в даній галузі, що включають тести на зв'язування або тести на активність, як описано тут.

[0100] Необмежувальні ілюстративні тести *in vitro* для вимірювання активності зв'язування ілюструються в Прикладах у даному описі. У Прикладі 3, афінності зв'язування і кінетичні константи людських антитіл проти PD-1 для PD-1 людини і PD-1 мавпи визначали за допомогою поверхневого плазмонного резонансу і вимірювання проводили на приладі Biacore 4000 або T200. У Прикладах 4 і 5, тести на блокування застосовували для визначення здатності антитіл проти PD-1 блокувати PD-L1-зв'язувальну здатність PD-1 *in vitro*. У Прикладі 6, тести на блокування застосовували для визначення перехресної конкуренції між антитілами проти PD-1. Приклад 7 описує зв'язування антитіл із клітинами, надекспресуючими PD-1. У Прикладі 8, люциферазний тест застосовували для визначення здатності антитіл проти PD-1 антагонізувати сигнальний шлях PD-1/PD-L1 у Т-клітинах.

[0101] У деяких варіантах здійснення, антитіла даного винаходу здатні підсилювати або стимулювати активацію Т-клітин *in vitro* і у суб'єкта зі злоякісним новоутворенням або у суб'єкта, інфікованого вірусом, таким як LCMV. У деяких варіантах здійснення, антитіла даного винаходу застосовують у комбінації з другим терапевтичним засобом, таким як антитіло до другого Т-клітинного співінгібітору, для посилення імунної відповіді і інгібування росту пухлини у суб'єкта.

[0102] Антитіла, специфічні до PD-1, можуть не містити додаткових міток або фрагментів або вони можуть містити N-кінцеві або C-кінцеві мітки або фрагменти. В одному варіанті здійснення, міткою або фрагментом є біотин. У тесті на зв'язування, положення мітки (якщо вона є) може визначати орієнтацію пептиду відносно поверхні, над якою пептид зв'язаний. Наприклад, якщо поверхня покрита авідином, пептид, що містить N-кінцевий біотин, буде орієнтований таким чином, що C-кінцева частина пептиду буде віддалена від поверхні. В одному варіанті здійснення, мітка може являти собою радіонуклід, флуоресцентний барвник або МРТ-виявлювану мітку. У деяких варіантах здійснення, такі мічені антитіла можуть застосовуватися в діагностичних аналітичних тестах, що включають тести з візуалізацією.

Антигензв'язувальні фрагменти антитіл

[0103] Якщо конкретно не зазначено інакше, термін "антитіло", як використовують у даному описі, варто розуміти як охоплюючий молекули антитіла, що містять два важких ланцюги імуноглобуліну і два легких ланцюги імуноглобуліну (тобто "молекули повного антитіла"), а також їх антигензв'язувальні фрагменти. Терміни "антигензв'язувальна частина" антитіла, "антигензв'язувальний фрагмент" антитіла і т. п., як використовують у даному описі, включають будь-який природний, одержуваний ферментативно, синтетичний або генетично сконструйований поліпептид або глікопротеїн, що специфічно зв'язується з антигеном з утворенням комплексу. Термін "антигензв'язувальний фрагмент" антитіла або "фрагмент антитіла", як використовують у даному описі, стосується одного або декількох фрагментів антитіла, які зберігають здатність специфічно зв'язуватися з PD-1. Фрагмент антитіла може включати Fab-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, Fv-фрагмент, dAb-фрагмент, фрагмент, що містить CDR, або ізольовану CDR. У деяких варіантах здійснення, термін "антигензв'язувальний фрагмент" стосується поліпептидного фрагмента мультиспецифічної антигензв'язувальної молекули. У таких варіантах здійснення, термін "антигензв'язувальний фрагмент" включає, наприклад, позаклітинний домен PD-L1, що специфічно зв'язується з PD-1. Антигензв'язувальні фрагменти антитіл можуть бути одержані, наприклад, з молекул повного антитіла, з використанням будь-яких придатних стандартних методів, таких як протеолітичне розщеплення або методи рекомбінантної генетичної інженерії, що включають маніпуляції й експресію ДНК, кодуючої варіабельні і (необов'язково) константні домени антитіла. Така ДНК є відомою і/або легкодоступною з, наприклад, комерційних джерел, бібліотек ДНК (що включають, наприклад, бібліотеки фаг-антитіл) або може бути синтезована. ДНК може бути секвенована й оброблена

хімічно або за допомогою використання методів молекулярної біології, наприклад, для розташування одного або декількох варіабельних і/або константних доменів у придатній конфігурації або для введення кодонів, створення цистеїнових залишків, модифікації, додавання або делеції амінокислот і т. д.

5 [0104] Необмежувальні приклади антигензв'язувальних фрагментів включають: (i) Fab-фрагменти; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти; (iii) Fd-фрагменти; (iv) Fv-фрагменти; (v) одноланцюжкові Fv (scFv) молекули; (vi) dAb-фрагменти; і (vii) мінімальні одиниці розпізнавання, що складаються з амінокислотних залишків, які імітують гіперваріабельну область антитіла (наприклад, ізольовану область, що визначає комплементарність (CDR), таку як CDR3-пептид), або обмежений пептид  
10 FR3-CDR3-FR4. Інші сконструйовані молекули, такі як доменспецифічні антитіла, одностановні антитіла, антитіла з виключеним доменом, химерні антитіла, CDR-щеплені антитіла, діатіла, триатіла, тетратіла, міні-тіла, нанотіла (наприклад, моновалентні нанотіла, бівалентні нанотіла і т. д.), малі модулярні імуофармацевтичні засоби (SMIP) і варіабельні IgNAR-домени акули, також охоплюються виразом "антигензв'язувальний фрагмент", як його використовують у  
15 даному описі.

[0105] Антигензв'язувальний фрагмент антитіла буде звичайно містити щонайменше один варіабельний домен. Варіабельний домен може мати будь-який розмір або амінокислотний склад і буде звичайно включати щонайменше одну CDR, що є суміжною або знаходиться в  
20 рамці з однією або декількома каркасними послідовностями. В антигензв'язувальних фрагментах, що мають V<sub>H</sub>-домен, асоційований з V<sub>L</sub>-доменом, V<sub>H</sub>- і V<sub>L</sub>-домени можуть знаходитися один відносно одного в будь-якому придатному розташуванні. Наприклад, варіабельна область може бути димерною і містити димери V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>, V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> або V<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>. Альтернативно, антигензв'язувальний фрагмент антитіла може містити мономерний V<sub>H</sub>- або V<sub>L</sub>-домен.

25 [0106] У деяких варіантах здійснення, антигензв'язувальний фрагмент антитіла може містити щонайменше один варіабельний домен, ковалентно зв'язаний щонайменше з одним константним доменом. Необмежувальні ілюстративні конфігурації варіабельних і константних доменів, які можуть бути виявлені в антигензв'язувальному фрагменті антитіла даного винаходу, включають: (i) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1; (ii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2; (iii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>3; (iv) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (v) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vi)  
30 V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vii) V<sub>H</sub>-C<sub>L</sub>; (viii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1; (ix) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2; (x) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>3; (xi) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (xii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (xiii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; і (xiv) V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>. У будь-якій конфігурації варіабельних і константних доменів, що включає будь-яку з ілюстративних конфігурацій, наведених вище, варіабельні і константні домени або можуть бути безпосередньо зв'язані один з одним, або можуть бути зв'язані за допомогою повної або часткової шарнірної або лінкерної області. Шарнірна область може  
35 складатися з щонайменше 2 (наприклад, 5, 10, 15, 20, 40, 60 або більше) амінокислот, що приводить до гнучкого або напівгнучкого зв'язування між сусідніми варіабельними і/або константними доменами в єдиній поліпептидній молекулі. Крім того, антигензв'язувальний фрагмент антитіла даного винаходу може містити гомодимер або гетеродимер (або інший мультимер) з будь-якими конфігураціями варіабельного і константного домену, наведеними  
40 вище, у нековалентній асоціації один з одним і/або з одним або декількома мономерними V<sub>H</sub>- або V<sub>L</sub>-доменами (наприклад, за допомогою дисульфідного зв'язку (зв'язків)).

[0107] Що стосується молекул повного антитіла, антигензв'язувальні фрагменти можуть бути моноспецифічними або мультиспецифічними (наприклад, біспецифічними). Мультиспецифічний антигензв'язувальний фрагмент антитіла буде звичайно містити щонайменше два різних  
45 варіабельних домени, де кожен варіабельний домен здатний до специфічного зв'язування з окремим антигеном або з різними епітопами на одному і тому ж антигені. Будь-який формат мультиспецифічного антитіла, що включає ілюстративні формати біспецифічного антитіла, розкриті тут, може бути адаптований для застосування в контексті антигензв'язувального фрагмента антитіла даного винаходу, з використанням рутинних методів, доступних у даній  
50 галузі.

Одержання людських антитіл

[0108] Способи генерації людських антитіл у трансгенних мишах є відомими в даній галузі. Будь-які такі відомі способи можуть застосовуватися в контексті даного винаходу для одержання людських антитіл, які специфічно зв'язуються з PD-1.

55 [0109] Імуноген, що містить будь-який з наступних, може застосовуватися для генерації антитіл до PD-1. У деяких варіантах здійснення, антитіла винаходу одержують з мишей, імунізованих з використанням непроцесованого нативного PD-1 (див. GenBank, обліковий номер NP\_005009.2) (SEQ ID NO: 327) або з використанням рекомбінантного пептиду PD-1. Альтернативно, PD-1 або його фрагмент може бути одержаний з використанням стандартних  
60 біохімічних методів і модифікований (SEQ ID NO: 321-324) і застосовуватися як імуноген.

[0110] У деяких варіантах здійснення, імуноген може являти собою пептид з N-термінального або C-термінального кінця PD-1. В одному варіанті здійснення, імуноген являє собою позаклітинний домен або IgV-подібний домен PD-1. У деяких варіантах здійснення винаходу, імуноген являє собою фрагмент PD-1, що знаходиться в приблизному інтервалі амінокислотних залишків 25-170 з SEQ ID NO: 327 зі зміною C93S.

[0111] У деяких варіантах здійснення, імуноген може являти собою рекомбінантний пептид PD-1, експресований у *E. coli* або в будь-яких інших еукаріотних клітинах або клітинах ссавців, таких як клітини яєчника китайського хом'яка (CHO).

[0112] У деяких варіантах здійснення, антитіла, що специфічно зв'язуються з PD-1, можуть бути одержані з використанням фрагментів відмічених вище областей або пептидів, що знаходяться за межами позначених областей на відстані приблизно 5-20 амінокислотних залишків від кожного з, або обох, N- або C-термінальних кінців областей, описаних тут. У деяких варіантах здійснення, будь-яка комбінація з відмічених вище областей або їх фрагментів може застосовуватися при одержанні PD-1-специфічних антитіл.

[0113] Застосовуючи технологію VELOCIMMUNE® (див., наприклад, US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) або будь-який інший відомий метод генерації моноклональних антитіл, спочатку виділяють химерні антитіла до PD-1 з високою афінністю, які мають людську варіабельну область і мишачу константну область. Технологія VELOCIMMUNE® включає генерацію трансгенної миші, яка має геном, що містить варіабельні області людських важкого і легкого ланцюгів, функціонально зв'язані з ендегенними локусами мишачої константної області таким чином, що миша продукує антитіло, яке містить людську варіабельну область і мишачу константну область, у відповідь на антигенну стимуляцію. ДНК, кодуючу варіабельні області важкого і легкого ланцюгів антитіла, виділяють і функціонально зв'язують з ДНК, кодуючою константні області людських важкого і легкого ланцюгів. ДНК потім експресують у клітині, здатній до експресії повністю людського антитіла.

#### Біоеквіваленти

[0114] Антитіла проти PD-1 і фрагменти антитіл даного винаходу охоплюють білки, що мають амінокислотні послідовності, які змінюються в порівнянні з послідовностями описаних антитіл, але які зберігають здатність зв'язуватися з PD-1. Такі варіанти антитіл і фрагменти антитіл містять одне або декілька доповнень, делецій або замінів амінокислот при порівнянні з батьківською послідовністю, але виявляють біологічну активність, яка є по суті еквівалентною активності описаних антитіл. Аналогічно, послідовності ДНК, кодуючі антитіла даного винаходу, охоплюють послідовності, які містять одне або декілька доповнень, делецій або замінів нуклеотидів при порівнянні з розкритою послідовністю, але які кодують антитіло або фрагмент антитіла, що по суті є біоеквівалентними антитілу або фрагменту антитіла винаходу.

[0115] Два антигензв'язувальні білки або антитіла вважаються біоеквівалентними, якщо, наприклад, вони є фармацевтичними еквівалентами або фармацевтичними альтернативами, швидкість і ступінь усмоктування яких не показують значної відмінності при введенні при однаковій молярній дозі в подібних експериментальних умовах, або однократної дози, або множинних доз. Деякі антитіла будуть вважатися еквівалентами або фармацевтичними альтернативами, якщо вони є еквівалентними по ступеню їх усмоктування, але не по їх швидкості усмоктування, і ще можуть вважатися біоеквівалентними, оскільки такі відмінності по швидкості усмоктування є навмисними і відображаються при міченні, не є суттєвими для досягнення ефективних концентрацій лікарського засобу в організмі при, наприклад, хронічному застосуванні і вважаються незначними в медичному відношенні для конкретного досліджуваного лікарського продукту.

[0116] В одному варіанті здійснення, два антигензв'язувальні білки є біоеквівалентними, якщо не існує клінічно значимих відмінностей по їх безпеці, чистоті або активності.

[0117] В одному варіанті здійснення, два антигензв'язувальні білки є біоеквівалентними, якщо пацієнт може переключатися один або більше разів між еталонним продуктом і біологічним продуктом без очікуваного збільшення ризику несприятливих ефектів, що включають клінічно значиму зміну імуногенності або знижену ефективність, у порівнянні з триваючою терапією без такого переключення.

[0118] В одному варіанті здійснення, два антигензв'язувальні білки є біоеквівалентними, якщо вони обидва діють за допомогою загального механізму або механізмів дії для стану або станів застосування, тією мірою, у якій такі механізми є відомими.

[0119] Біоеквівалентність може бути продемонстрована методами *in vivo* і/або *in vitro*. Вимірювання біоеквівалентності включають, наприклад, (а) тест *in vivo* у людей або інших ссавців, у яких концентрацію антитіла або його метаболітів вимірюють у крові, плазмі, сироватці або іншій біологічній рідині як функцію від часу; (б) тест *in vitro*, що корелювався і був

обґрунтовано прогнозує дані по біодоступності у людини *in vivo*; (с) тест *in vivo* у людей або інших ссавців, у яких відповідний гострий фармакологічний ефект антитіла (або його мішені) вимірюють як функцію від часу; і (d) добре контрольоване клінічне випробування, що встановлює безпеку, ефективність дії або біодоступність або біоеквівалентність антитіла.

[0120] Біоеквівалентні варіанти антитіл винаходу можуть бути побудовані за допомогою, наприклад, проведення різних заміни залишків або послідовностей або делеції термінальних або внутрішніх залишків або послідовностей, непотрібних для біологічної активності. Наприклад, залишки цистеїну, які не є суттєвими для біологічної активності, можуть бути піддані делеції або замінені на інші амінокислоти, щоб запобігти утворенню непотрібних або некоректних внутрішньомолекулярних дисульфідних містків при ренатурації. В інших контекстах, біоеквівалентні антитіла можуть включати варіанти антитіл, які містять амінокислотні зміни, що модифікують характеристики глікозилювання антитіл, наприклад мутації, що виключають або видаляють глікозилювання.

Антитіла проти PD-1, які містять Fc-варіанти

[0121] Відповідно до деяких варіантів здійснення даного винаходу, надані антитіла проти PD-1, які містять Fc-домен, що містить одну або більше мутацій, які підсилюють або ослабляють зв'язування антитіла з рецептором FcRn, наприклад при кислому pH у порівнянні з нейтральним pH. Наприклад, даний винахід включає антитіла проти PD-1, які містять мутацію в C<sub>H</sub>2- або C<sub>H</sub>3-області Fc-домену, де мутація (мутації) збільшує афінність Fc-домену до FcRn у кислому оточенні (наприклад, у ендосомі, де pH знаходиться в інтервалі від приблизно 5,5 до приблизно 6,0). Такі мутації можуть приводити до збільшення періоду напівжиття антитіла в сироватці, при введенні тварині. Необмежувальні приклади таких модифікацій Fc включають, наприклад, модифікацію в положенні 250 (наприклад, E або Q); 250 і 428 (наприклад, L або F); 252 (наприклад, L/Y/F/W або T), 254 (наприклад, S або T) і 256 (наприклад, S/R/Q/E/D або T) або модифікацію в положенні 428 і/або 433 (наприклад, H/L/R/S/P/Q або K) і/або 434 (наприклад, A, W, H, F або Y [N434A, N434W, N434H, N434F або N434Y]); або модифікацію в положенні 250 і/або 428; або модифікацію в положенні 307 або 308 (наприклад, 308F, V308F) і 434. В одному варіанті здійснення, модифікація включає модифікацію 428L (наприклад, M428L) і 434S (наприклад, N434S); 428L, 259I (наприклад, V259I) і модифікацію 308F (наприклад, V308F); модифікацію 433K (наприклад, H433K) і 434 (наприклад, 434Y); модифікацію 252, 254 і 256 (наприклад, 252Y, 254T і 256E); модифікацію 250Q і 428L (наприклад, T250Q і M428L) і модифікацію 307 і/або 308 (наприклад, 308F або 308P). У ще одному іншому варіанті здійснення, модифікація включає модифікацію 265A (наприклад, D265A) і/або 297A (наприклад, N297A).

[0122] Наприклад, даний винахід включає антитіла проти PD-1, які містять Fc-домен, що містить одну або декілька пар або груп мутацій, вибраних із групи, що складається з: 250Q і 248L (наприклад, T250Q і M248L); 252Y, 254T і 256E (наприклад, M252Y, S254T і T256E); 428L і 434S (наприклад, M428L і N434S); 257I і 311I (наприклад, P257I і Q311I); 257I і 434H (наприклад, P257I і N434H); 376V і 434H (наприклад, D376V і N434H); 307A, 380A і 434A (наприклад, T307A, E380A і N434A); і 433K і 434F (наприклад, H433K і N434F). В одному варіанті здійснення, даний винахід включає антитіла проти PD-1, які містять Fc-домен, що містить мутацію S108P у шарнірній області IgG4 для ініціації стабілізації димеру. Усі можливі комбінації наведених вище мутацій Fc-домену і інші мутації у варіабельних доменах антитіла, розкритого тут, мають на увазі включеними в обсяг даного винаходу.

[0123] Даний винахід також включає антитіла проти PD-1, які містять химерну константну (C<sub>H</sub>) область важкого ланцюга, де химерна C<sub>H</sub>-область містить сегменти, що є похідними C<sub>H</sub>-областей з більше ніж одного ізо типу імунoglobуліну. Наприклад, антитіла винаходу можуть містити химерну C<sub>H</sub>-область, що містить частину C<sub>H</sub>2-домену або весь C<sub>H</sub>2-домен, похідний від молекули людського IgG1, людського IgG2 або людського IgG4, у сполученні з частиною C<sub>H</sub>3-домену або всім C<sub>H</sub>3-доменом, похідним від молекули людського IgG1, людського IgG2 або людського IgG4. Відповідно до деяких варіантів здійснення, антитіла винаходу містять химерну C<sub>H</sub>-область, що має химерну шарнірну область. Наприклад, химерний шарнір може містити амінокислотну послідовність "верхнього шарніра" (амінокислотні залишки з положень 216-227 відповідно до нумерації EU), похідну від шарнірної області людського IgG1, людського IgG2 або людського IgG4, у сполученні з послідовністю "нижнього шарніра" (амінокислотні залишки з положень 228-236 відповідно до нумерації EU), що є похідною від шарнірної області людського IgG1, людського IgG2 або людського IgG4. Відповідно до деяких варіантів здійснення, химерна шарнірна область містить амінокислотні залишки, похідні від верхнього шарніра людського IgG1 або людського IgG4, і амінокислотні залишки, похідні від нижнього шарніра людського IgG2. Антитіло, що містить химерну C<sub>H</sub>-область, описану в даному документі, може, у деяких

варіантах здійснення, виявляти ефекторні функції модифікованого Fc без надання негативного впливу на терапевтичні або фармакокінетичні властивості антитіла (див., наприклад, USSN. 14/170,166, подану 31 січня 2014 р., розкриття якої повністю включене в даний опис за допомогою посилання).

5 Біологічні характеристики антитіл

[0124] У цілому, антитіла даного винаходу функціонують за допомогою зв'язування з PD-1. Даний винахід включає антитіла проти PD-1 і їх антигензв'язувальні фрагменти, що зв'язують розчинні мономерні або димерні молекули PD-1 з високою афінністю. Наприклад, даний винахід включає антитіла й антигензв'язувальні фрагменти антитіл, що зв'язують мономерний PD-1 (наприклад, при 25 °C або при 37 °C) з  $K_D$ , меншою ніж приблизно 50 нМ, виміряною за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, наприклад, з використанням формату тесту, визначеного в Прикладі 3 даного опису. У деяких варіантах здійснення, антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти зв'язують мономерний PD-1 з  $K_D$ , меншою ніж приблизно 40 нМ, меншою ніж приблизно 30 нМ, меншою ніж приблизно 20 нМ, меншою ніж приблизно 10 нМ, меншою ніж приблизно 5 нМ, меншою ніж приблизно 2 нМ або меншою ніж приблизно 1 нМ, виміряною за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, наприклад, з використанням формату тесту, визначеного в Прикладі 3 даного опису, або по суті аналогічного тесту.

[0125] Даний винахід також включає антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти, що зв'язують димерний PD-1 (наприклад, при 25 °C або при 37 °C) з  $K_D$ , меншою ніж приблизно 400 пМ, виміряною за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, наприклад, з використанням формату тесту, визначеного в Прикладі 3 даного опису. У деяких варіантах здійснення, антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти зв'язують димерний PD-1 з  $K_D$ , меншою ніж приблизно 300 пМ, меншою ніж приблизно 250 пМ, меншою ніж приблизно 200 пМ, меншою ніж приблизно 100 пМ або меншою ніж приблизно 50 пМ, виміряною за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, наприклад, з використанням формату тесту, визначеного в Прикладі 3 даного опису, або по суті аналогічного тесту.

[0126] Даний винахід також включає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які зв'язують PD-1 мавпи (*Macaca fascicularis*) (наприклад, при 25 °C або при 37 °C) з  $K_D$ , меншою ніж приблизно 35 нМ, виміряною за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, наприклад, з використанням формату тесту, визначеного в Прикладі 3 даного опису. У деяких варіантах здійснення, антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти зв'язують PD-1 мавпи з  $K_D$ , меншою ніж приблизно 30 нМ, меншою ніж приблизно 20 нМ, меншою ніж приблизно 15 нМ, меншою ніж приблизно 10 нМ, або меншою ніж приблизно 5 нМ, виміряною за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, наприклад, з використанням формату тесту, визначеного в Прикладі 3 даного опису, або по суті аналогічного тесту.

[0127] Даний винахід також включає антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти, що зв'язують PD-1 з періодом половинної дисоціації ( $t_{1/2}$ ), більшим ніж приблизно 1,1 хвилина, виміряним за допомогою поверхневого плазмонного резонансу при 25 °C або 37 °C, наприклад, з використанням формату тесту, визначеного в Прикладі 3 даного опису, або по суті аналогічного тесту. У деяких варіантах здійснення, антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти даного винаходу зв'язують PD-1 з  $t_{1/2}$ , більшим ніж приблизно 5 хвилин, більшим ніж приблизно 10 хвилин, більшим ніж приблизно 30 хвилин, більшим ніж приблизно 50 хвилин, більшим ніж приблизно 60 хвилин, більшим ніж приблизно 70 хвилин, більшим ніж приблизно 80 хвилин, більшим ніж приблизно 90 хвилин, більшим ніж приблизно 100 хвилин, більшим ніж приблизно 200 хвилин, більшим ніж приблизно 300 хвилин, більшим ніж приблизно 400 хвилин, більшим ніж приблизно 500 хвилин, більшим ніж приблизно 600 хвилин, більшим ніж приблизно 700 хвилин, більшим ніж приблизно 800 хвилин, більшим ніж приблизно 900 хвилин, більшим ніж приблизно 1000 хвилин або більшим ніж приблизно 1200 хвилин, виміряним за допомогою поверхневого плазмонного резонансу при 25 °C або 37 °C, наприклад, з використанням формату тесту, визначеного в Прикладі 3 даного опису (наприклад, формат mAb-захоплення або захоплення антигену), або по суті аналогічного тесту.

[0128] Даний винахід також включає антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, які блокують зв'язування PD-1 з PD-L1 з  $IC_{50}$ , меншою ніж приблизно 3 нМ, визначеною з використанням тесту на основі імуноаналізу ELISA, наприклад, як показано в Прикладі 4, або по суті аналогічного тесту. Даний винахід також включає антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти, які зв'язуються з PD-1 і підсилюють зв'язування PD-1 з PD-L1.

[0129] У деяких варіантах здійснення, антитіла даного винаходу можуть зв'язуватися з позаклітинним доменом PD-1 або з фрагментом домену. У деяких варіантах здійснення, антитіла даного винаходу можуть зв'язуватися з більше ніж одним доменом (крос-реактивні антитіла). У деяких варіантах здійснення, антитіла даного винаходу можуть зв'язуватися з

епітопом, розташованим у позаклітинному домені, що містить амінокислотні залишки 21-171 PD-1 (SEQ ID NO: 327). В одному варіанті здійснення, антитіла можуть зв'язуватися з епітопом, який містить одну або декілька амінокислот, вибраних із групи, що складається з амінокислотних залишків 1-146 з SEQ ID NO: 321-324.

5 [0130] У деяких варіантах здійснення, антитіла даного винаходу можуть функціонувати за допомогою блокування або інгібування PD-L1-зв'язувальної активності, асоційованої з PD-1, за допомогою зв'язування з будь-якою іншою областю або фрагментом непроецесованого білка, амінокислотна послідовність якого показана в SEQ ID NO: 327. У деяких варіантах здійснення, антитіла можуть ослабляти або модулювати взаємодію між PD-1 і PD-L1.

10 [0131] У деяких варіантах здійснення, антитіла даного винаходу можуть являти собою біспецифічні антитіла. Біспецифічні антитіла винаходу можуть зв'язувати один епітоп в одному домені і також можуть зв'язувати другий епітоп в іншому домені PD-1. У деяких варіантах здійснення, біспецифічні антитіла винаходу можуть зв'язувати два різних епітопи в одному і тому ж домені. В одному варіанті здійснення, мультиспецифічна антигензв'язувальна молекула  
15 включає першу специфічність зв'язування, де перша специфічність зв'язування включає позаклітинний домен або його фрагмент PD-L1; і другу специфічність зв'язування з ще одним епітопом з PD-1.

[0132] В одному варіанті здійснення, винахід надає ізольоване повністю людське моноклональне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що зв'язується з PD-1, де  
20 антитіло або його фрагмент виявляє одну або декілька з наступних характеристик: (i) містить HCVR, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 218, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 306 і 314, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; (ii)  
25 містить LCVR, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186 і 202, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; (iii) містить домен HCDR3, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136,  
30 152, 168, 184, 200, 216, 224, 232, 240, 248, 256, 264, 272, 280, 288, 296, 304, 312 і 320, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; і домен LCDR3, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192 і 208, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; (iv)  
35 містить домен HCDR1, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 220, 228, 236, 244, 252, 260, 268, 276, 284, 292, 300, 308 і 316, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; домен HCDR2, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 222, 230,  
40 238, 246, 254, 262, 270, 278, 286, 294, 302, 310 і 318, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; домен LCDR1, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188 і 204, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; і домен LCDR2, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190 і 206, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; (v)  
45 являє собою мультиспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка містить першу специфічність зв'язування з PD-1 і другу специфічність зв'язування з антигеном, вибраним із групи, що складається з PD-1, пухлиноспецифічного антигену, специфічного антигену аутоімунної тканини, антигену клітини, інфікованої вірусом, іншого Т-клітинного співінгібітору, Т-клітинного рецептора і Fc-рецептора; (vi) зв'язується з PD-1 людини з  $K_D$ , що дорівнює приблизно 28 пМ - 1,5 мкМ; (vii) зв'язується з PD-1 мавпи з  $K_D$ , що дорівнює приблизно 3 нМ - 7,5 мкМ; (viii) блокує або підсилює зв'язування PD-1 з PD-L1 з  $IC_{50}$   $\leq$  приблизно 3,3 нМ; (ix) блокує PD-1-індуковану Т-клітинну понижувальну регуляцію і/або рятує сигнальний шлях Т-клітин у тесті з Т-клітинами/APC люциферазним репортером; (x) стимулює проліферацію й активність Т-клітин у  
50 тесті зі змішаною реакцією лімфоцитів (MLR); (xi) індукує вироблення IL-2 і/або IFN $\gamma$  в

аналітичному тесті MLR; і (xii) пригнічує ріст пухлини і збільшує виживаність у суб'єктів зі злоякісним новоутворенням.

[0133] В одному варіанті здійснення, винахід надає ізольоване повністю людське моноклональне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що блокує зв'язування PD-1 з PD-L1, де антитіло або його фрагмент виявляє одну або декілька з наступних характеристик: (i) містить HCVR, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 130, 162, 234 і 314, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; (ii) містить LCVR, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 138, 170, 186 і 202, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; (iii) містить домен HCDR3, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 136, 168, 240 і 320, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; і домен LCDR3, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 144, 176, 192 і 208, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; (iv) містить домен HCDR1, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 132, 164, 236 і 316, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; домен HCDR2, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 134, 166, 238 і 318, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; домен LCDR1, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 140, 172, 188 і 204, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; і домен LCDR2, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 142, 174, 190 і 206, або по суті аналогічну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; (v) являє собою мультиспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка включає першу специфічність зв'язування з PD-1 і другу специфічність зв'язування з антигеном, вибраним із групи, що складається з іншого епітопа PD-1, пухлиноспецифічного антигену, специфічного антигену аутоімунної тканини, антигену клітини, інфікованої вірусом, іншого Т-клітинного співінгібітору, Т-клітинного рецептора і Fc-рецептора; (vi) зв'язується з PD-1 людини з  $K_D \leq 10^{-9}$  M; (vii) зв'язується з PD-1 мавпи з  $K_D \leq 10^{-8}$  M; (viii) блокує зв'язування PD-1 з PD-L1 з  $IC_{50} \leq 10^{-10}$  M; (ix) блокує PD-1-індуковану Т-клітинну понижувальну регуляцію і/або рятує сигнальний шлях Т-клітин у тесті Т-клітини/APC люциферазний репортер; (x) стимулює проліферацію й активність Т-клітин у тесті зі змішаною реакцією лімфоцитів (MLR); (xi) індукує вироблення IL-2 і/або IFN $\gamma$  в аналітичному тесті MLR; і (xii) пригнічує ріст пухлини і збільшує виживаність у суб'єктів зі злоякісним новоутворенням.

[0134] Антитіла даного винаходу можуть мати одну або декілька з зазначених вище біологічних характеристик або будь-які їх комбінації. Інші біологічні характеристики антитіл даного винаходу будуть очевидними для рядового фахівця в даній галузі з огляду даного розкриття, що включає наведені в ньому робочі Приклади.

Видова селективність і видова крос-реактивність

[0135] Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу, антитіла проти PD-1 зв'язуються з PD-1 людини, але не зв'язуються з PD-1 від іншого виду. Альтернативно, антитіла проти PD-1 винаходу, у деяких варіантах здійснення, зв'язуються з PD-1 людини і з PD-1 від одного або декількох видів, що не є людиною. Наприклад, антитіла проти PD-1 винаходу можуть зв'язуватися з PD-1 людини і можуть зв'язуватися або не зв'язуватися, у деяких випадках, з PD-1 від одного або декількох з миші, щура, морської свинки, хом'яка, піщанки, свині, кішки, собаки, кролика, кози, вівці, корови, коня, верблюда, макаки, мавпи, резусу або шимпанзе. У деяких варіантах здійснення, антитіла проти PD-1 винаходу можуть зв'язуватися з PD-1 людини і PD-1 мавпи з однаковими афінностями або з різними афінностями, але не зв'язуватися з щурячим і мишачим PD-1.

Картування епітопів і споріднені технології

[0136] Даний винахід включає антитіла проти PD-1, які взаємодіють з однією або декількома амінокислотами, виявленими усередині одного або декількох доменів молекули PD-1, що включають, наприклад, позаклітинний (IgV-подібний) домен, трансмембранний домен і внутрішньоклітинний домен, який містить інгібуючий мотив імунорецептора (ITIM) і

перемикаючий на основі тирозину мотив імунорецептора (ITSM). Епітоп, з яким антитіла зв'язуються, може складатися з одиначної граничної послідовності з 3 або більше (наприклад, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 або більше) амінокислот, розташованих усередині будь-якого з зазначених вище доменів молекули PD-1 (наприклад, лінійного епітопа в домені). Альтернативно, епітоп може складатися з множини неграничних амінокислот (або амінокислотних послідовностей), розташованих усередині кожного або обох із зазначених вище доменів молекули PD-1 (наприклад, конформаційного епітопа).

[0137] Різні методи, відомі рядовому фахівцю в даній галузі, можуть застосовуватися для визначення того, "чи взаємодіє антитіло з однією або декількома амінокислотами" усередині поліпептиду або білка. Ілюстративні методи включають, наприклад, рутинні тести перехресного блокування, такі, як описані в *Antibodies*, Harlow і Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Інші методи включають аналіз мутацій при скануванні аланіну, блотинг-аналіз пептидів (Reineke (2004), *Methods Mol. Biol.* 248:443-63), кристалографічні дослідження аналізу розщеплення пептидів і аналіз методом ЯМР. На доповнення, можуть використовуватися методи, такі як вирізання епітопів, екстракція епітопів і хімічна модифікація антигенів (Tomer (2000), *Prot. Sci.* 9:487-496). Ще один метод, який може застосовуватися для ідентифікації амінокислот усередині поліпептиду, з яким антитіло взаємодіє, є обмін водень/дейтерій, виявлюваний мас-спектрометрією. Загалом, метод обміну водень/дейтерій включає мічення дейтерієм білка, що представляє інтерес, з наступним зв'язуванням антитіла з міченим дейтерієм білком. Далі, комплекс білок/антитіло переносять у воду й обмінювані протони усередині амінокислот, що захищені комплексом з антитілом, піддаються зворотному обміну дейтерію на водень при більш повільній швидкості, ніж обмінювані протони, усередині амінокислот, що не є частиною поверхні поділу фаз. У результаті, амінокислоти, що утворюють частину поверхні поділу фаз білок/антитіло, можуть утримувати дейтерій і, отже, виявляють відносно більш високу масу в порівнянні з амінокислотами, не включеними в поверхню поділу фаз. Після дисоціації антитіл, цільовий білок піддають розщепленню протеазою і проводять мас-спектрометричний аналіз, таким чином, відображаючи мічені дейтерієм залишки, що відповідають конкретним амінокислотам, з якими антитіло взаємодіє. Див., наприклад, Ehring (1999), *Analytical Biochemistry*, 267:252-259; Engen and Smith (2001), *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

[0138] Термін "епітоп" стосується ділянки на антигені, на яку реагують В- і/або Т-клітини. В-клітинні епітопи можуть бути утворені як з граничних амінокислот, так і з неграничних амінокислот, що знаходяться поруч, за допомогою третинного складання білка. Епітопи, утворені з граничних амінокислот, звичайно зберігаються при впливі денатуруючих розчинників, у той час як епітопи, утворені за допомогою третинного складання, звичайно губляться при обробці денатуруючими розчинниками. Епітоп звичайно включає щонайменше 3 і більш звичайно щонайменше 5 або 8-10 амінокислот в унікальній просторовій конформації.

[0139] Профілювання за допомогою модифікації (MAP), також відоме як профілювання антитіла на основі структури антигену (ASAP), являє собою метод, який категоризує велике число моноклональних антитіл (mAb), спрямованих проти одного і того ж антигену відповідно до аналогій профілю зв'язування кожного антитіла з хімічно або ферментативно модифікованими поверхнями антигенів (див. US 2004/0101920, спеціально повністю включено в даний опис за допомогою посилання). Кожна категорія може відображати унікальний епітоп, який або чітко відрізняється від епітопа, представленого іншою однією категорією, або частково перекривається з ним. Ця технологія забезпечує швидку фільтрацію генетично ідентичних антитіл, таким чином, що характеристика може бути сфокусована на генетично відмінних антитілах. При застосуванні в скринінгу гібридом, MAP може сприяти ідентифікації рідких клонів гібридами, які продукують mAb, що мають бажані характеристики. MAP може застосовуватися для сортування антитіл винаходу в групі антитіл, що зв'язують різні епітопи.

[0140] У деяких варіантах здійснення, антитіла проти PD-1 або їх антигензв'язувальні фрагменти зв'язуються з епітопом усередині будь-яких однієї або декількох з областей, представлених у PD-1, або в природній формі, як представлено в SEQ ID NO: 327, або одержаних рекомбінантно, як представлено в SEQ ID NO: 321-324, або з його фрагментом. У деяких варіантах здійснення, антитіла винаходу зв'язуються з позаклітинною областю, що містить одну або декілька амінокислот, вибраних із групи, яка складається з амінокислотних залишків 21-171 з PD-1. У деяких варіантах здійснення, антитіла винаходу зв'язуються з позаклітинною областю, що містить одну або декілька амінокислот, вибраних із групи, яка складається з амінокислотних залишків 1-146 PD-1 мавпи, як представлено SEQ ID NO: 322.

[0141] У деяких варіантах здійснення, антитіла винаходу, як показано в Таблиці 1, взаємодіють з щонайменше однією амінокислотою послідовністю, вибраною з групи, яка складається з амінокислотних залишків в інтервалі від приблизно положення 21 до приблизно



положення 136 з SEQ ID NO: 327 або амінокислотних залишків в інтервалі від приблизно положення 136 до приблизно положення 171 з SEQ ID NO: 327. Ці області частково представлені в SEQ ID NO: 321-324.

[0142] Даний винахід включає антитіла проти PD-1, що зв'язуються з одним і тим же епітопом або частиною епітопа, як будь-яке з конкретних ілюстративних антитіл, описаних у даному документі в Таблиці 1, або антитіло, що має послідовності CDR будь-якого з ілюстративних антитіл, описаних у Таблиці 1. Аналогічно, даний винахід також включає антитіла проти PD-1, що конкурують за зв'язування з PD-1 або фрагментом PD-1, з будь-яким з конкретних ілюстративних антитіл, описаних тут у Таблиці 1, або антитілом, що має послідовності CDR будь-якого з ілюстративних антитіл, описаних у Таблиці 1. Наприклад, даний винахід включає антитіла проти PD-1, що перехресно конкурують за зв'язування з PD-1 з одним або декількома антитілами, визначеними в Прикладі 6 даного опису (наприклад, H2aM7788N, H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P і H2aM7795N).

[0143] Можна легко визначити, чи зв'язується антитіло з одним і тим же епітопом або конкурує за зв'язування з ним з еталонним антитілом проти PD-1, за допомогою використання рутинних методів, відомих у даній галузі. Наприклад, щоб визначити, чи зв'язується тестоване антитіло з одним і тим же епітопом, як еталонне антитіло проти PD-1 винаходу, забезпечують зв'язування еталонного антитіла з білком або пептидом PD-1 в умовах насичення. Далі, оцінюють здатність тестованого антитіла зв'язуватися з молекулою PD-1. Якщо тестоване антитіло здатне зв'язуватися з PD-1 після насичувального зв'язування з еталонним антитілом проти PD-1, можна зробити висновок, що тестоване антитіло зв'язується з іншим епітопом, ніж еталонне антитіло проти PD-1. З іншого боку, якщо тестоване антитіло не здатне зв'язуватися з білком PD-1 після насичувального зв'язування з еталонним антитілом проти PD-1, тоді тестоване антитіло може зв'язуватися з таким же епітопом, як епітоп, зв'язаний з еталонним антитілом проти PD-1 винаходу.

[0144] Щоб визначити, чи конкурує антитіло за зв'язування з еталонним антитілом проти PD-1, описану вище методологію зв'язування здійснюють у двох орієнтаціях. У першій орієнтації, забезпечують зв'язування еталонного антитіла з білком PD-1 в умовах насичення з наступною оцінкою зв'язування тестованого антитіла з молекулою PD-1. В другій орієнтації, забезпечують зв'язування тестованого антитіла з молекулою PD-1 в умовах насичення з наступною оцінкою зв'язування еталонного антитіла з молекулою PD-1. Якщо в обох орієнтаціях, тільки перше (насичувальне) антитіло здатне до зв'язування з молекулою PD-1, тоді роблять висновок, що тестоване антитіло й еталонне антитіло конкурують за зв'язування з PD-1. Як буде зрозуміло рядовому фахівцю в даній галузі, антитіло, конкуруюче за зв'язування з еталонним антитілом, не обов'язково може зв'язуватися з ідентичним епітопом, як еталонне антитіло, але може стерично блокувати зв'язування еталонного антитіла за допомогою зв'язування епітопа, що перекривається, або сусіднього епітопа.

[0145] Два антитіла зв'язуються з одним і тим же епітопом або епітопом, що перекривається, якщо кожне конкурентно інгібує (блокує) зв'язування іншого з антигеном. Таким чином, 1-, 5-, 10-, 20- або 100-кратний надлишок одного антитіла інгібує зв'язування іншого на щонайменше 50 %, але переважно 75 %, 90 % або навіть 99 %, виміряне в тесті на конкурентне зв'язування (див., наприклад, Junghans et al., Cancer Res. 1990, 50:1495-1502). Альтернативно, два антитіла мають один і той же епітоп, якщо по суті всі амінокислотні мутації в антигені, які зменшують або виключають зв'язування одного антитіла, зменшують або виключають зв'язування іншого. Два антитіла мають епітопи, що перекриваються, якщо деякі амінокислотні мутації, які зменшують або виключають зв'язування одного антитіла, зменшують або виключають зв'язування іншого.

[0146] Додаткове рутинне експериментування (наприклад, пептидна мутація й аналізи зв'язування) може потім проводитися для підтвердження того, чи спостерігається нестача зв'язування тестованого антитіла фактично внаслідок зв'язування з тим же епітопом, що і для еталонного антитіла, або чи є стеричне блокування (або ще одне явище) відповідальним за нестачу спостережуваного зв'язування. Експерименти цього типу можуть проводитися з використанням ELISA, PIA, поверхневого плазмонного резонансу, проточної цитометрії або будь-якого іншого кількісного або якісного тесту на зв'язування антитіла, доступного в даній галузі.

#### Імунокон'югати

[0147] Винахід охоплює людське моноклональне антитіло проти PD-1, кон'юговане з терапевтичним фрагментом ("імунокон'югатом"), таким як цитотоксин, або хіміотерапевтичним засобом для лікування злоякісного новоутворення. Як використовують у даному описі, термін

"імунокон'югат" стосується антитіла, яке є хімічно або біологічно зв'язаним з цитотоксином, радіоактивною речовиною, цитокіном, інтерфероном, цільовим або репортерним фрагментом, ферментом, токсином, пептидом або білком або терапевтичним засобом. Антитіло може бути зв'язане з цитотоксином, радіоактивною речовиною, цитокіном, інтерфероном, цільовим або репортерним фрагментом, ферментом, токсином, пептидом або терапевтичним засобом по будь-якому розташуванню уздовж молекули, оскільки воно здатне зв'язуватися зі своєю мішенню. Приклади імунокон'югатів включають кон'югати антитіла з лікарським засобом і гібридними білками антитіло-токсин. В одному варіанті здійснення, засіб може являти собою друге відмінне антитіло до PD-1. У деяких варіантах здійснення, антитіло може бути кон'юговане з засобом, специфічним для пухлинної клітини або клітини, інфікованої вірусом. Тип терапевтичного фрагмента, що може бути кон'югований з антитілом проти PD-1, буде вибраний з урахуванням стану, що підлягає лікуванню, і бажаного терапевтичного ефекту, якого необхідно досягти. Приклади придатних засобів для утворення імунокон'югатів відомі в даній галузі; див., наприклад, WO 05/103081.

Мультиспецифічні антитіла

[0148] Антитіла даного винаходу можуть бути моноспецифічними, біспецифічними або мультиспецифічними. Мультиспецифічні антитіла можуть бути специфічними для різних епітопів одного цільового поліпептиду або можуть містити антигензв'язувальні домени, специфічні для більше ніж одного цільового поліпептиду. Див., наприклад, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244.

[0149] В одному аспекті, даний винахід включає мультиспецифічні антигензв'язувальні молекули або їх антигензв'язувальні фрагменти, де одна специфічність імуноглобуліну є специфічною для позаклітинного домену PD-1 або його фрагмента, а інша специфічність імуноглобуліну є специфічною для зв'язування з зовнішнім позаклітинним доменом PD-1 або другої терапевтичної мішені або є кон'югованою з терапевтичним фрагментом. У деяких варіантах здійснення, перша антигензв'язувальна специфічність може містити PD-L1 або PD-L2 або їх фрагмент. У деяких варіантах здійснення винаходу, одна специфічність імуноглобуліну є специфічною для епітопа, що містить амінокислотні залишки 21-171 з PD-1 (SEQ ID NO: 327), або його фрагмента, а інша специфічність імуноглобуліну є специфічною для другого цільового антигену. Другий цільовий антиген може знаходитися на тій же клітині, що і PD-1, або на іншій клітині. В одному варіанті здійснення, друга цільова клітина є імунною клітиною, що відрізняється від Т-клітини, такою як В-клітина, антигенпрезентуюча клітина, моноцит, макрофаг або дендритна клітина. У деяких варіантах здійснення, другий цільовий антиген може бути присутній на пухлинній клітині або клітині аутоімунної тканини або на клітині, інфікованій вірусом.

[0150] У ще одному іншому аспекті, винахід надає мультиспецифічні антигензв'язувальні молекули або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять першу антигензв'язувальну специфічність, що зв'язується з PD-1, і другу антигензв'язувальну специфічність, що зв'язується з Т-клітинним рецептором, В-клітинним рецептором або Fc-рецептором. У спорідненому аспекті, винахід надає мультиспецифічні антигензв'язувальні молекули або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять першу антигензв'язувальну специфічність, що зв'язується з PD-1, і другу антигензв'язувальну специфічність, що зв'язується з іншим Т-клітинним співінгібітором, таким як LAG-3, CTLA-4, BTLA, CD-28, 2B4, LY108, TIGIT, TIM3, LAIR1, ICOS і CD160.

[0151] У ще одному іншому аспекті, винахід надає мультиспецифічні антигензв'язувальні молекули або їх антигензв'язувальні фрагменти, які містять першу антигензв'язувальну специфічність, що зв'язується з PD-1, і другу антигензв'язувальну специфічність, що зв'язується з антигеном, специфічним для аутоімунної тканини. У деяких варіантах здійснення, антитіла можуть бути активуючими або агоністичними антитілами.

[0152] Будь-яка з мультиспецифічних антигензв'язувальних молекул винаходу, або її варіанти, може бути побудована з використанням стандартних методів молекулярної біології (наприклад, технології рекомбінантної ДНК і експресії білка), як відомо рядовому фахівцю в даній галузі.

[0153] У деяких варіантах здійснення, PD-1-специфічні антитіла генерують у біспецифічному форматі ("біспецифічні"), у якому варіабельні області, що зв'язуються з відмінними доменами PD-1, зв'язуються разом для надання подвійної доменної специфічності в межах єдиної зв'язувальної молекули. Відповідно сконструйовані біспецифічні молекули можуть підсилювати загальну інгібуючу PD-1 ефективність дії за допомогою збільшення як специфічності, так і зв'язувальної авідності. Варіабельні області зі специфічністю для індивідуальних доменів (наприклад, сегментів N-кінцевого домену), або які можуть зв'язуватися з різними областями усередині одного домену, є спареними на структурному каркасі, що дозволяє кожній області

одночасно зв'язуватися з роздільними епітопами або з різними областями усередині одного домену. В одному прикладі біспецифічної молекули, варіабельні області важкого ланцюга ( $V_H$ ) зі зв'язуючого зі специфічністю для одного домену рекомбінують з варіабельними областями легкого ланцюга ( $V_L$ ) з ряду зв'язуючих зі специфічністю для другого домену, щоб ідентифікувати неочікувані партнери  $V_L$ , які можуть бути спарені з вихідним  $V_H$  без порушення вихідної специфічності для цього  $V_H$ . Таким чином, одиничний сегмент  $V_L$  (наприклад,  $V_{L1}$ ) може комбінуватися з двома різними доменами  $V_H$  (наприклад,  $V_{H1}$  і  $V_{H2}$ ) для генерації біспецифічної молекули, складеної з двох зв'язувальних "плечей" ( $V_{H1}$ - $V_{L1}$  і  $V_{H2}$ - $V_{L1}$ ). Застосування одиничного сегмента  $V_L$  знижує складність системи і, таким чином, спрощує операції і збільшує ефективність у процесах клонування, експресії й очищення, застосовуваних для генерації біспецифічної молекули (див., наприклад, USSN13/022759 і US2010/0331527).

[0154] Альтернативно, антитіла, що зв'язуються з декількома доменами і другою мішенню, такі як, але не обмежені наведеним, наприклад, друге інше антитіло проти PD-1, можуть бути одержані в біспецифічному форматі з використанням методів, описаних у даному документі, або інших методів, відомих кваліфікованим фахівцям в даній галузі. Варіабельні області антитіла, що зв'язуються з відмінними областями, можуть бути зв'язані разом з варіабельними областями, що зв'язуються з потрібними ділянками, наприклад на позаклітинному домені PD-1, для надання подвійної антигенної специфічності в межах єдиної зв'язувальної молекули. Відповідно сконструйовані біспецифічні молекули такої природи виконують подвійну функцію. Варіабельні області зі специфічністю для позаклітинного домену комбінують з варіабельною областю зі специфічністю для зовнішнього позаклітинного домену і спарюють на структурному каркасі, що забезпечує зв'язування кожної варіабельної області з роздільними антигенами.

[0155] Формат ілюстративного біспецифічного антитіла, яке може застосовуватися в контексті даного винаходу, включає застосування  $C_H3$ -домену першого імуноглобуліну (Ig) і  $C_H3$ -домену другого Ig, де  $C_H3$ -домени першого і другого Ig відрізняються один від одного щонайменше однією амінокислотою і де щонайменше одна амінокислотна відмінність знижує зв'язування біспецифічного антитіла з Білком А у порівнянні з біспецифічним антитілом, у якому відсутня амінокислотна відмінність. В одному варіанті здійснення,  $C_H3$ -домен першого Ig зв'язується з Білком А, а  $C_H3$ -домен другого Ig містить мутацію, яка знижує або відмінняє зв'язування з Білком А, таку як модифікація (по нумерації IMGT екзонів; H435R по нумерації EU). Другий  $C_H3$  може додатково містити модифікацію (по IMGT; Y436F по EU). Додаткові модифікації, які можуть бути виявлені усередині другого  $C_H3$ , включають: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M і V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M і V422I по EU) у випадку антитіла IgG1; N44S, K52N і V82I (по IMGT; N384S, K392N і V422I по EU) у випадку антитіла IgG2; і Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q і V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q і V422I по EU) у випадку антитіла IgG4. Варіації форматів біспецифічних антитіл, описаних вище, розглядаються як включені в межі обсягу даного винаходу.

[0156] Інші ілюстративні біспецифічні формати, які можуть застосовуватися в контексті даного винаходу, включають, без обмеження, наприклад, біспецифічні формати на основі scFv або діатіла, гібриди IgG-scFv, домен з подвійною варіабельністю (DVD)-Ig, квадруму, формат виступи-в-западини, загальний легкий ланцюг (наприклад, загальний легкий ланцюг з форматом виступи-в-западини і т. д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)тіло, лейцинову блискавку, дуотіло, IgG1/IgG2, подвійної дії Fab (DAF)-IgG, і Mab<sup>2</sup> біспецифічні формати (див., наприклад, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, і посилання, цитовані в ній, для огляду наведених вище форматів). Біспецифічні антитіла також можуть бути побудовані з використанням кон'югації пептид/нуклеїнова кислота, наприклад, де неприродні амінокислоти з ортогональною хімічною реактивністю застосовують для генерації сайт-специфічних кон'югатів антитіло-олігонуклеотид, які потім піддаються самозбиранню в мультимерні комплекси з заданими складом, валентністю і геометрією (див., наприклад, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Терапевтичне введення і лікарські форми

[0157] Винахід надає терапевтичні композиції, які містять антитіла проти PD-1 даного винаходу або їх антигензв'язувальні фрагменти. Терапевтичні композиції відповідно до винаходу будуть вводитися разом із придатними носіями, ексципієнтами й іншими засобами, які вводять у лікарські форми для забезпечення поліпшеного перенесення, доставки, переносимості і т. п. Множину відповідних лікарських форм можна знайти в довіднику, відомому всім хімікам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Ці лікарські форми включають, наприклад, порошки, пасти, мазі, желе, воски, масла, ліпіди, везикули, що містять ліпіди (катионні або аніонні) (такі як ЛІПОФЕКТИН™), кон'югати ДНК, безводні поглинаючі пасти, емульсії типу масло-в-воді і вода-в-маслі, емульсії карбоваксу (поліетиленгліколі з різною молекулярною масою), напівтверді гелі і напівтверді суміші, що

містять карбовакс. Див. також Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations", PDA (1998), J. Pharm. Sci Technol. 52:238-311.

[0158] Доза антитіла може варіювати залежно від віку і розміру суб'єкта, якому будуть її вводити, цільового захворювання, стану, шляху введення і т. п. Коли антитіло даного винаходу застосовують для лікування захворювання або розладу у дорослого пацієнта або для запобігання такому захворюванню, переважним є вводити антитіло даного винаходу звичайно при однократній дозі, що дорівнює приблизно від 0,1 до приблизно 60 мг/кг маси тіла, більш переважно від приблизно 5 до приблизно 60 мг/кг, від приблизно 10 до приблизно 50 мг/кг або від приблизно 20 до приблизно 50 мг/кг маси тіла. Залежно від тяжкості стану, частоту і тривалість лікування можна регулювати. У деяких варіантах здійснення, антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент винаходу може вводитися у вигляді початкової дози, що дорівнює щонайменше від приблизно 0,1 до приблизно 800 мг, від приблизно 1 до приблизно 500 мг, від приблизно 5 до приблизно 300 мг або від приблизно 10 до приблизно 200 мг, до приблизно 100 мг або до приблизно 50 мг. У деяких варіантах здійснення, початкова доза може супроводжуватися введенням другої або множини наступних доз антитіла або його антигензв'язувального фрагмента в кількості, яка може бути приблизно такою ж або меншою, ніж кількість початкової дози, де наступні дози розділені у часі на щонайменше від 1 дня до 3 днів; щонайменше один тиждень, щонайменше 2 тижні; щонайменше 3 тижні; щонайменше 4 тижні; щонайменше 5 тижнів; щонайменше 6 тижнів; щонайменше 7 тижнів; щонайменше 8 тижнів; щонайменше 9 тижнів; щонайменше 10 тижнів; щонайменше 12 тижнів або щонайменше 14 тижнів.

[0159] Різні системи доставки є відомими і можуть застосовуватися для введення фармацевтичної композиції винаходу, наприклад інкапсулювання в ліпосоми, мікрочастинки, мікрокапсули, рекомбінантні клітини, здатні до експресії мутантних вірусів, опосередкований рецептором ендцитоз (див., наприклад, Wu et al. (1987), J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Методи введення включають, але не обмежуються перерахованим, внутрішньошкірний, черезшкірний, внутрішньом'язовий, внутрішньоочеревинний, внутрішньовенний, підшкірний, інтраназальний, епідуральний і пероральний шляхи. Композиція може вводитися за допомогою будь-якого зручного шляху, наприклад за допомогою інфузії або болюсної ін'єкції, за допомогою усмоктування через епітеліальні або слизово-шкірні вистілки (наприклад, слизову оболонку порожнини рота, слизові оболонки прямої кишки і кишечника і т. д.) і може вводитися разом з іншими біологічно активними засобами. Введення може бути системним або місцевим. Фармацевтична композиція також може доставлятися у везикулі, зокрема ліпосомі (див., наприклад, Langer (1990), Science, 249:1527-1533).

[0160] Застосування наночастинок для доставки антитіла даного винаходу також передбачене в даному описі. Кон'юговані з антитілом наночастинок можуть використовуватися як для терапевтичних, так і для діагностичних застосувань. Кон'юговані з антитілом наночастинок і способи одержання і застосування описані докладно в Arruebo M. et al. 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" in J. Nanomat. Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389), включений в даний опис за допомогою посилання. Наночастинок можуть бути розроблені і кон'юговані з антитілами, що містяться у фармацевтичних композиціях, щоб цілеспрямовано діяти на пухлинні клітини або клітини аутоімунних тканин, або клітини, інфіковані вірусом. Наночастинок для доставки лікарського засобу також були описані, наприклад, у US 8257740 або US 8246995, кожна з яких повністю включена в даний опис.

[0161] У деяких ситуаціях, фармацевтична композиція може бути доставлена в системі з контрольованим вивільненням. В одному варіанті здійснення, може застосовуватися насос. У ще одному іншому варіанті здійснення, можуть застосовуватися полімерні матеріали. У ще одному іншому варіанті здійснення, система з контрольованим вивільненням може поміщуватися поблизу мішені для композиції, таким чином, вимагаючи тільки фракції системної дози.

[0162] Ін'єкційні препарати можуть включати дозовані форми для внутрішньовенних, підшкірних, внутрішньошкірних, внутрішньоочеревинних, внутрішньом'язових ін'єкцій, краплинних інфузій і т. д. Ці ін'єкційні препарати можуть бути одержані загальновідомими методами. Наприклад, ін'єкційні препарати можуть бути одержані, наприклад, за допомогою розчинення, суспендування або емульгування антитіл або їх солей, описаних вище, у стерильному водному середовищі або масляному середовищі, традиційно застосовуваних для ін'єкцій. Як водне середовище для ін'єкцій можуть бути використані, наприклад, фізіологічний розчин, ізотонічний розчин, що містить глюкозу й інші допоміжні засоби і т. д., які можуть застосовуватися в комбінації з відповідним солюбілізатором, таким як

спирт (наприклад, етанол), поліспирт (наприклад, пропіленгліколь, поліетиленгліколь), неіоногенна поверхнево-активна речовина [наприклад, полісорбат 80, HCO-50 (поліоксіетиленовий (50 моль) аддукт гідрованої касторової олії)] і т. д. Як масляне середовище використовують, наприклад, кунжутну олію, соєву олію і т. д., які можуть застосовуватися в комбінації із солюбілізатором, таким як бензилбензоат, бензиловий спирт і т. д. Ін'єкцією, приготовленою таким чином, переважно заповнюють відповідну ампулу.

[0163] Фармацевтична композиція даного винаходу може бути доставлена підшкірно або внутрішньовенно з використанням стандартної голки і шприца. На доповнення, стосовно підшкірної доставки, шприц-ручка для доставки, мабуть, має застосування при доставці фармацевтичної композиції даного винаходу. Така шприц-ручка для доставки може бути багаторазовою або одноразовою. У багаторазовій шприц-ручці для доставки звичайно використовують змінний картридж, що містить фармацевтичну композицію. Як тільки уся фармацевтична композиція в картриджі вводиться і картридж спорожнюється, порожній картридж може легко бути утилізований і замінений на новий картридж, що містить фармацевтичну композицію. Шприц-ручка для доставки може потім повторно використовуватися. В одноразовій шприц-ручці для доставки змінний картридж відсутній. Замість цього, одноразову шприц-ручку для доставки одержують попередньо заповненою фармацевтичною композицією, що міститься в резервуарі в пристрої. Як тільки резервуар звільняється від фармацевтичної композиції, цілий пристрій утилізують.

[0164] Численні пристрої для доставки у вигляді ручки й автоінжектора доставки знаходять застосування при підшкірній доставці фармацевтичної композиції даного винаходу. Приклади включають, але, безсумнівно, не обмежуються перерахованими, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland), ручку HUMALOG MIX 75/25™, ручку HUMALOG™, ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II і III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ і OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), причому наведено тільки декілька прикладів. Приклади одноразових шприц-ручок для доставки, що мають застосування при підшкірній доставці фармацевтичної композиції даного винаходу, включають, але, безсумнівно, не обмежуються перерахованими, ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) і KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоінжектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) і ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), причому наведено тільки декілька прикладів.

[0165] Переважно, фармацевтичні композиції для перорального або парентерального застосування, описані вище, одержують у вигляді дозованих форм в однократній дозі, придатній для забезпечення дози активних інгредієнтів. Такі дозовані форми в стандартній дозі включають, наприклад, таблетки, пігулки, капсули, ін'єкції (ампули), супозиторії і т. д. Кількість антитіла, що міститься в дозованій формі, звичайно складає від приблизно 5 до приблизно 500 мг на дозовану форму в однократній дозі; особливо у формі ін'єкції, переважно, щоб антитіло містилося в кількості від приблизно 5 до приблизно 100 мг і від приблизно 10 до приблизно 250 мг для інших дозованих форм.

Терапевтичні застосування антитіл

[0166] Антитіла винаходу є застосовними, серед іншого, для лікування, запобігання і/або зменшення тяжкості будь-якого захворювання або розладу, асоційованого з або опосередкованого експресією, сигнальним шляхом або активністю PD-1 або вилікованого за допомогою блокування взаємодії між PD-1 і лігандом PD-1 (наприклад, PD-L1 або PD-L2) або іншого інгібування активності і/або сигнального шляху PD-1. Наприклад, даний винахід надає способи лікування злоякісного новоутворення (інгібування росту пухлини), хронічних вірусних інфекцій і/або аутоімунного захворювання за допомогою введення антитіла проти PD-1 (або фармацевтичної композиції, що містить антитіло проти PD-1), описаного у даному документі, пацієнту, що потребує такого лікування. Антитіла даного винаходу є застосовними для лікування, запобігання і/або зменшення тяжкості захворювання, розладу або стану, такого як злоякісне новоутворення, аутоімунне захворювання або вірусна інфекція, і/або для зменшення щонайменше одного симптому, асоційованого з таким захворюванням, розладом або станом. У контексті способів лікування, описаних у даному документі, антитіло проти PD-1 може вводиться у вигляді монотерапії (тобто тільки як терапевтичний засіб) або в комбінації з одним або декількома додатковими терапевтичними засобами (приклади яких описані в різних розділах даного опису).

[0167] У деяких варіантах здійснення винаходу, антитіла, описані в даному документі, є застосовними для лікування суб'єктів, що страждають на первинне або рецидивуюче злоякісне новоутворення, яке включає, але не обмежене наведеними, нирковоклітинну карциному, рак ободової і прямої кишки, недрібноклітинний рак легень, рак мозку (наприклад, мультиформну гліобластому), плоскоклітинний рак області голови і шиї, рак шлунка, рак простати, рак яєчника, рак нирки, рак молочної залози, множинну мієлому і меланому.

[0168] Антитіла можуть застосовуватися для лікування симптомів на ранній стадії або пізній стадії злоякісного новоутворення. В одному варіанті здійснення, антитіло винаходу або його фрагмент може застосовуватися для лікування метастазуючого злоякісного новоутворення. Антитіла є застосовними при зниженні, інгібуванні або зменшенні росту пухлини як для солідних пухлин, так і для гематологічних злоякісних новоутворень. У деяких варіантах здійснення, лікування антитілом винаходу або його антигензв'язувальним фрагментом приводить до більше ніж 50 % регресії, більше ніж 60 % регресії, більше ніж 70 % регресії, більше ніж 80 % регресії або більше ніж 90 % регресії пухлини у суб'єкта. У деяких варіантах здійснення, антитіла можуть застосовуватися для запобігання рецидиву пухлини. У деяких варіантах здійснення, антитіла є застосовними для збільшення загальної виживаності у суб'єкта зі злоякісним новоутворенням. У деяких варіантах здійснення, антитіла є застосовними при зниженні токсичності внаслідок хіміотерапії або променевої терапії, у той же час підтримуючи довгострокову виживаність у пацієнта, що страждає на злоякісне новоутворення.

[0169] У деяких варіантах здійснення, антитіла винаходу є застосовними для лікування суб'єктів, що страждають на хронічну вірусну інфекцію. У деяких варіантах здійснення, антитіла винаходу є застосовними при зниженні концентрацій вірусів у хазяїна і/або порятунку виснажених Т-клітин. У деяких варіантах здійснення, антитіло винаходу або його фрагмент може застосовуватися для лікування хронічної вірусної інфекції, що викликається вірусом лімфоцитарного хоріомеїнігіту (LCMV). У деяких варіантах здійснення, антитіло винаходу або його антигензв'язувальний фрагмент може вводитися в терапевтичній дозі пацієнту, інфікованому вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ) або вірусом папіломи людини (HPV), або вірусом гепатиту В/С (HBV/HCV). У близькому варіанті здійснення, антитіло винаходу або його антигензв'язувальний фрагмент може застосовуватися для лікування інфекції, що викликається вірусом імунодефіциту мавпи (SIV), у мавпи-суб'єкта, такої як макака.

[0170] У деяких варіантах здійснення, блокуюче антитіло даного винаходу може вводитися в терапевтично ефективній кількості суб'єкту, що страждає на злоякісне новоутворення або вірусну інфекцію.

[0171] У деяких варіантах здійснення, антитіла винаходу є застосовними для лікування аутоімунного захворювання, що включає, але не обмежене наведеними, осередкову алопецію, аутоімунний гепатит, целиацію, хворобу Грейвса, синдром Гієна-Барре, тиреоїдит Хашимото, гемолітичну анемію, запальне захворювання кишечнику, запальні міопатії, розсіяний склероз, первинний біліарний цироз, псоріаз, ревматоїдний артрит, склеродерму, синдром Шегрена, системний червоний вовчак, вітиліго, аутоімунний панкреатит, аутоімунну кропивницю, аутоімунну тромбоцитопенічну пурпуру, хворобу Крона, діабет типу I, еозинофільний фасціїт, еозинофільний ентерогастрит, синдром Гудпасчера, важку міастенію, псоріатичний артрит, ревматичну пропасницю, виразковий коліт, васкуліт і гранулематоз Вегенера. У деяких варіантах здійснення, активуюче антитіло винаходу може застосовуватися для лікування суб'єкта, що страждає на аутоімунне захворювання.

[0172] Одне або декілька антитіл даного винаходу можуть вводитися для ослаблення, запобігання або зниження тяжкості одного або більше симптомів або станів захворювання або розладу.

[0173] У даному описі також передбачене профілактичне застосування одного або декількох антитіл даного винаходу для пацієнтів, що мають ризик розвитку захворювання або розладу, такого як злоякісне новоутворення, аутоімунне захворювання і хронічна вірусна інфекція.

[0174] У додатковому варіанті здійснення винаходу дані антитіла застосовують для одержання препарату фармацевтичної композиції для лікування пацієнтів, що страждають на злоякісне новоутворення, аутоімунне захворювання або вірусну інфекцію. У ще одному іншому варіанті здійснення винаходу, дані антитіла застосовують як допоміжну терапію разом з будь-яким іншим засобом або будь-якою іншою терапією, відомою кваліфікованим фахівцям в даній галузі, застосовною для лікування злоякісного новоутворення, аутоімунного захворювання або вірусної інфекції.

Комбіновані терапії і лікарські форми

[0175] Комбіновані терапії можуть включати антитіло проти PD-1 винаходу і будь-який додатковий терапевтичний засіб, які можуть переважно комбінуватися з антитілом винаходу або з біологічно активним фрагментом антитіла винаходу.

[0176] Антитіла даного винаходу можуть комбінуватися синергетично з одним або декількома протипухлинними засобами або терапією, застосовуваною для лікування злогокісного новоутворення, яке включає, наприклад, нирковоклітинну карциному, рак ободової і прямої кишки, мультиформну гліобластому, плоскоклітинний рак області голови і шиї, недрібноклітинний рак легень, рак товстої кишки, рак яєчника, аденокарциному, рак простати, гліому і меланому. У даному винаході передбачене застосування антитіл проти PD-1 винаходу в комбінації з імуностимулюючими і/або імунопідтримуючими терапіями, щоб інгібувати ріст пухлини і/або збільшити виживаність пацієнтів зі злогокісним новоутворенням. Імуностимулюючі терапії включають прямі імуностимулюючі терапії для посилення активності імунних клітин за допомогою або "розгальмовування" пригнічених імунних клітин, або "натиску", щоб активувати імунну відповідь. Приклади включають цілеспрямовану дію на інші контрольні рецептори, вакцинацію й ад'юванти. Імунопідтримуючі модальності можуть збільшити антигенність пухлини за допомогою ініціації смерті імуногенних клітин, запалення або мати інші опосередковані ефекти, що ініціюють протипухлинну імунну відповідь. Приклади включають опромінювання, хіміотерапію, антиагіогенні засоби і хірургічне втручання.

[0177] У різних варіантах здійснення, одне або декілька антитіл даного винаходу можуть застосовуватися в комбінації з антитілом до PD-L1, другим антитілом до PD-1 (наприклад, ніволумабом), інгібітором LAG-3, інгібітором CTLA-4 (наприклад, іпіліумабом), інгібітором TIM3, інгібітором BTLA, інгібітором TIGIT, інгібітором CD47, антагоністом ще одного Т-клітинного інгібітору або ліганду (наприклад, антитілом до CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 або VISTA), інгібітором індоламін-2,3-діоксигенази (IDO), антагоністом фактора росту судинного ендотелію (VEGF) [наприклад, "VEGF-пасткою", такою як афліберцепт, або іншим VEGF-інгібуючим гібридним білком, наведеним у US 7,087,411, або антитілом проти VEGF або антигензв'язувальним фрагментом (наприклад, бевацизумабом або ранібізумабом) або низькомолекулярним інгібітором кінрази рецептора VEGF (наприклад, сунітинібом, сорафенібом або пазопанібом)], Ang2-інгібітором (наприклад, несвакумабом), інгібітором трансформуючого фактора росту бета (TGF $\beta$ ), інгібітором рецептора епідермального фактора росту (EGFR) (наприклад, ерлотинібом, цетуксимабом), агоністом костимулюючого рецептора (наприклад, агоністом глюкостероїд-індукованого TNFR-спорідненого білка), антитілом до пухлиноспецифічного антигену (наприклад, CA9, CA125, асоційованого з меланомою антигену 3 (MAGE3), карциноємбріональним антигеном (CEA), віментином, пухлина-M2-PK, простат-специфічним антигеном (PSA), муцином-1, MART-1 і CA19-9), вакциною (наприклад, бацилою Кальметта-Герена, протираковою вакциною), ад'ювантом для збільшення презентації антигену (наприклад, гранулоцитарним-макрофагальним колонієстимулюючим фактором), біспецифічним антитілом (наприклад, біспецифічним антитілом CD3хCD20, біспецифічним антитілом PSMAхCD3), цитотоксином, хіміотерапевтичним засобом (наприклад, дакарбазином, темозоломідом, циклофосфамідом, доцетакселом, доксорубіцином, даунорубіцином, цисплатином, карбоплатином, гемцитабіном, метотрексатом, мітоксантроном, оксаліплатином, паклітакселом і вінкристином), циклофосфамідом, променевою терапією, інгібітором IL-6R (наприклад, сарилумабом), інгібітором IL-4R (наприклад, дупілумабом), інгібітором IL-10, цитокином, таким як IL-2, IL-7, IL-21 і IL-15, кон'югатом антитіло-лікарський засіб (ADC) (наприклад, анти-CD19-DM4 ADC і анти-DS6-DM4 ADC), протизапальним лікарським засобом (наприклад, кортикостероїдами і нестероїдними протизапальними лікарськими засобами), харчовою добавкою, такою як антиоксиданти, або будь-яким паліативним засобом для лікування злогокісного новоутворення. У деяких варіантах здійснення, антитіла проти PD-1 даного винаходу можуть застосовуватися в комбінації з протираковими вакцинами, що включають вакцини проти дендритних клітин, онколітичні віруси, вакцини пухлинних клітин і т. д., для посилення протипухлинної відповіді. Приклади протиракових вакцин, які можуть застосовуватися в комбінації з антитілами проти PD-1 даного винаходу, включають вакцину MAGE3 проти меланоми і раку сечового міхура, вакцину MUC1 проти раку молочної залози, EGFRv3 (наприклад, Риндопепімут) проти раку мозку (включаючи мультиформну гліобластому) або LVAC-CEA (проти CEA+рак).

[0178] У деяких варіантах здійснення, антитіла проти PD-1 винаходу можуть вводитися в комбінації з променевою терапією в способах для генерації довгострокових протипухлинних відповідей і/або збільшення виживаності пацієнтів зі злогокісним новоутворенням. У деяких варіантах здійснення, антитіла проти PD-1 винаходу можуть вводитися до введення, одночасно з введенням або після введення променевої терапії пацієнту зі злогокісним новоутворенням.

Наприклад, променева терапія може вводитися в одній або декількох дозах у пухлинні ушкодження з наступним введенням однієї або декількох доз антитіла проти PD-1 винаходу. У деяких варіантах здійснення, променева терапія може вводитися місцево в пухлинне ушкодження для збільшення місцевої імуногенності пухлини пацієнта (ад'ювантне опромінювання) і/або для знищення пухлинних клітин (аблятивне опромінювання) з наступним системним введенням антитіла проти PD-1 винаходу. Наприклад, внутрішньочерепне опромінення може вводитися пацієнту з раком мозку (наприклад, мультиформною гліобластомою) у комбінації із системним введенням антитіла проти PD-1 винаходу. У деяких варіантах здійснення, антитіла проти PD-1 винаходу можуть вводитися в комбінації з променевою терапією і хіміотерапевтичним засобом (наприклад, темозоломідом) або антагоністом VEGF (наприклад, афліберцептом).

[0179] У деяких варіантах здійснення, антитіла проти PD-1 винаходу можуть вводитися в комбінації з одним або декількома протівірусними лікарськими засобами для лікування хронічних вірусних інфекцій, що викликаються LCMV, ВІЛ, HPV, HBV або HCV. Приклади протівірусних лікарських засобів включають, але не обмежуються перерахованим, зидовудин, ламівудин, абакавір, рибавірин, лопінавір, ефавіренц, кобіцистат, тенофовір, рилпівірин і кортикостероїди. У деяких варіантах здійснення, антитіла проти PD-1 винаходу можуть вводитися в комбінації з інгібітором LAG3, інгібітором CTLA-4 або будь-яким антагоністом ще одного іншого Т-клітинного співінгібітору для лікування хронічної вірусної інфекції.

[0180] У деяких варіантах здійснення, антитіла проти PD-1 винаходу можуть комбінуватися з антитілом до Fc-рецептора на імунних клітинах для лікування аутоімунного захворювання. В одному варіанті здійснення, антитіло винаходу або його фрагмент вводять у комбінації з антитілом або антигензв'язувальним білком, націленим на антиген, специфічний до аутоімунної тканини. У деяких варіантах здійснення, антитіло винаходу або його антигензв'язувальний фрагмент вводять у комбінації з антитілом або антигензв'язувальним білком, що цілеспрямовано діє на Т-клітинний рецептор або В-клітинний рецептор, які включають, але не обмежені наведеними, Fc $\alpha$  (наприклад, CD89), Fc $\gamma$  (наприклад, CD64, CD32, CD16a і CD16b), CD19 і т. д. Антитіла винаходу або їх фрагменти можуть застосовуватися в комбінації з будь-яким лікарським засобом або терапією, відомими в даній галузі (наприклад, кортикостероїдами й іншими імуносупресорами) для лікування аутоімунного захворювання або розладу, що включає, але не обмежений перерахованими, осередкову алопецію, аутоімунний гепатит, целіакію, хворобу Грейвса, синдром Гійєна-Барре, тиреоїдит Хашимото, гемолітичну анемію, запальне захворювання кишечника, запальні міопатії, розсіяний склероз, первинний біліарний цироз, псоріаз, ревматоїдний артрит, склеродерму, синдром Шегрена, системний червоний вовчак, вітиліго, аутоімунний панкреатит, аутоімунну кропивницю, аутоімунну тромбоцитопенічну пурпуру, хворобу Крона, діабет типу I, еозинофільний фасціїт, еозинофільний ентерогастрит, синдром Гудпасчера, важку міастенію, псоріатичний артрит, ревматичну пропасницю, виразковий коліт, васкуліт і гранулематоз Вегенера.

[0181] Додаткові терапевтично активні засоби/компоненти можуть вводитися перед введенням, одночасно з введенням або після введення антитіла проти PD-1 даного винаходу. Для цілей даного розкриття, такі режими введення розглядають як введення антитіла проти PD-1 "у комбінації з" другим терапевтично активним компонентом.

[0182] Додаткові терапевтично активні компоненти можуть вводитися суб'єкту перед введенням антитіла проти PD-1 даного винаходу. Наприклад, перший компонент може вважатися таким, що вводиться "перед" другим компонентом, якщо перший компонент вводять за 1 тиждень до, 72 години до, 60 годин до, 48 годин до, 36 годин до, 24 години до, 12 годин до, 6 годин до, 5 годин до, 4 години до, 3 години до, 2 години до, 1 годину до, 30 хвилин до, 15 хвилин до, 10 хвилин до, 5 хвилин до або менше ніж за 1 хвилину до введення другого компонента. В інших варіантах здійснення, додаткові терапевтично активні компоненти можуть вводитися суб'єкту після введення антитіла проти PD-1 даного винаходу. Наприклад, перший компонент може вважатися таким, що вводиться "після" другого компонента, якщо перший компонент вводять через 1 хвилину після, 5 хвилин після, 10 хвилин після, 15 хвилин після, 30 хвилин після, 1 годину після, 2 години після, 3 години після, 4 години після, 5 годин після, 6 годин після, 12 годин після, 24 години після, 36 годин після, 48 годин після, 60 годин після, 72 години після введення другого компонента. У ще інших варіантах здійснення, додаткові терапевтично активні компоненти можуть вводитися суб'єкту супутньо з введенням антитіла проти PD-1 даного винаходу. "Супутнє" введення, для цілей даного винаходу, включає, наприклад, введення антитіла проти PD-1 і додаткового терапевтично активного компонента суб'єкту в разовій дозованій формі (наприклад, спільно складеній) або в роздільних дозованих формах, що вводяться суб'єкту в межах приблизно 30 хвилин або менше одна від одної. Якщо



введення проводять у роздільних дозованих формах, кожна дозована форма може вводитися через один і той же шлях (наприклад, як антитіло проти PD-1, так і додатковий терапевтично активний компонент можуть вводитися внутрішньовенно, підшкірно і т. д.); альтернативно, кожна дозована форма може вводитися різними шляхами (наприклад, антитіло проти PD-1 може вводитися внутрішньовенно, а додатковий терапевтично активний компонент може вводитися підшкірно). При будь-якій події, будь-яке введення компонентів у разовій дозованій формі, у роздільних дозованих формах за допомогою одного і того ж шляху або в роздільних дозованих формах за допомогою різних шляхів вважають "супутнім введенням" для цілей даного розкриття. Для цілей даного розкриття, введення антитіла проти PD-1 "перед введенням", "супутньо із введенням" або "після введення" (як ці терміни визначені в даному описі вище) додаткового терапевтично активного компонента розглядають як введення антитіла проти PD-1 "у комбінації з" додатковим терапевтично активним компонентом.

[0183] Даний винахід включає фармацевтичні композиції, у яких антитіло проти PD-1 даного винаходу складають лікарську форму з одним або декількома додатковими терапевтично активними компонентами, як описано в будь-якому розділі даного опису, використовуючи різноманітні комбінації дозувань.

[0184] В ілюстративних варіантах здійснення, у яких антитіло проти PD-1 винаходу вводять у комбінації з антагоністом VEGF (наприклад, VEGF-пасткою, такою як афліберцепт), включаючи введення спільних лікарських форм, що містять антитіло проти PD-1 і антагоніст VEGF, індивідуальні компоненти можуть вводитися суб'єкту і/або спільно бути складені в лікарську форму з використанням різноманітних комбінацій дозувань. Наприклад, антитіло проти PD-1 може вводитися суб'єкту і/або міститися в спільній лікарській формі в кількості, вибраній із групи, що складається з 0,01 мг, 0,02 мг, 0,03 мг, 0,04 мг, 0,05 мг, 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг, 0,5 мг, 0,6 мг, 0,7 мг, 0,8 мг, 0,9 мг, 1,0 мг, 1,5 мг, 2,0 мг, 2,5 мг, 3,0 мг, 3,5 мг, 4,0 мг, 4,5 мг, 5,0 мг, 6,0 мг, 7,0 мг, 8,0 мг, 9,0 мг і 10,0 мг; і антагоніст VEGF (наприклад, VEGF-пастка, така як афліберцепт) може вводитися суб'єкту і/або міститися в спільній лікарській формі в кількості, вибраній із групи, що складається з 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг, 0,5 мг, 0,6 мг, 0,7 мг, 0,8 мг, 0,9 мг, 1,0 мг, 1,1 мг, 1,2 мг, 1,3 мг, 1,4 мг, 1,5 мг, 1,6 мг, 1,7 мг, 1,8 мг, 1,9 мг, 2,0 мг, 2,1 мг, 2,2 мг, 2,3 мг, 2,4 мг, 2,5 мг, 2,6 мг, 2,7 мг, 2,8 мг, 2,9 мг і 3,0 мг. Комбінації/спільні лікарські форми можуть вводитися суб'єкту відповідно до будь-якого з режимів введення, розкритих де-небудь ще в даному описі, включаючи, наприклад, двічі на тиждень, однократно щотижня, однократно кожного 2 тижня, однократно кожного 3 тижня, однократно кожен місяць, однократно кожні 2 місяці, однократно кожні 3 місяці, однократно кожні 4 місяці, однократно кожні 5 місяців, однократно кожні 6 місяців і т. д.

#### Режими введення

[0185] Відповідно до деяких варіантів здійснення даного винаходу, множинні дози антитіла проти PD-1 (або фармацевтична композиція, що містить комбінацію антитіла проти PD-1 і будь-якого з додаткових терапевтично активних засобів, зазначених у даному описі) можуть вводитися суб'єкту протягом заданого періоду часу. Способи відповідно до цього аспекту винаходу включають послідовне введення суб'єкту множини доз антитіла проти PD-1 винаходу. Як використовують у даному описі, "послідовне введення" означає, що кожен дозу антитіла проти PD-1 вводять суб'єкту в різних часових точках, наприклад у різні дні, розділені попередньо визначеним інтервалом (наприклад, годинами, днями, тижнями або місяцями). Даний винахід включає способи, які включають послідовне введення пацієнту однократної початкової дози антитіла проти PD-1, з наступними однією або декількома вторинними дозами антитіла проти PD-1 і, необов'язково, з наступними однією або декількома третинними дозами антитіла проти PD-1. Антитіло проти PD-1 може вводитися при дозі між 0,1 мг/кг і 100 мг/кг.

[0186] Терміни "початкова доза" "вторинні дози" і "третинні дози" стосуються часової послідовності введення антитіла проти PD-1 винаходу. Таким чином, "початкова доза" є дозою, яку вводять на початку режиму лікування (також названою "вихідна доза"); "вторинні дози" являють собою дози, які вводять після початкової дози; і "третинні дози" являють собою дози, які вводять після вторинних доз. Усі початкові, вторинні і третинні дози можуть містити однакову кількість антитіла проти PD-1, але звичайно можуть відрізнятися одна від одної відносно частоти введення. У деяких варіантах здійснення, однак, кількості антитіла проти PD-1, що містяться в початкових, вторинних і/або третинних дозах, варіюють одна відносно одної (наприклад, регулюються з підвищенням або зниженням, за необхідності) у ході лікування. У деяких варіантах здійснення, дві або декілька доз (наприклад, 2, 3, 4 або 5) вводять на початку режиму лікування як "навантажувальні дози", супроводжувані наступними дозами, які вводять на менш частій основі (наприклад, "підтримуючі дози").

[0187] У деяких ілюстративних варіантах здійснення даного винаходу, кожен вторинну і/або третинну дозу вводять протягом від 1 до 26 (наприклад, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ або більше) тижнів після безпосередньо попередньої дози. Фраза "безпосередньо попередня доза", як використовують у даному описі, означає, в послідовності множини введення, дозу антитіла проти PD-1, яку вводять пацієнту перед введенням наступної дози в послідовності без яких-небудь проміжних доз.

[0188] Способи відповідно до цього аспекту винаходу можуть включати введення пацієнту будь-якого числа вторинних і/або третинних доз антитіла проти PD-1. Наприклад, у деяких варіантах здійснення, пацієнту вводять тільки однократну вторинну дозу. В інших варіантах здійснення, пацієнту вводять дві або більше (наприклад, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або більше) вторинних доз. Аналогічно, у деяких варіантах здійснення, пацієнту вводять тільки єдину третинну дозу. В інших варіантах здійснення, пацієнту вводять дві або більше (наприклад, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або більше) третинних доз.

[0189] У варіантах здійснення, які включають множину вторинних доз, кожен вторинну дозу можуть вводити з такою ж частотою, як для інших вторинних доз. Наприклад, кожна вторинна доза може вводитися пацієнту через 1-2 тижні або 1-2 місяці після безпосередньо попередньої дози. Аналогічно, у варіантах здійснення, які включають множину третинних доз, кожна третинна доза може вводитися з тією ж частотою, як і інші третинні дози. Наприклад, кожна третинна доза може вводитися пацієнту через 2-12 тижнів після безпосередньо попередньої дози. У деяких варіантах здійснення винаходу, частота, з якою вторинні і/або третинні дози вводять пацієнту, може варіювати протягом проходження режиму лікування. Частота введення може також регулюватися в ході лікування терапевтом залежно від потреб індивідуального пацієнта після клінічного обстеження.

[0190] Даний винахід включає введення режимів, при яких від 2 до 6 навантажувальних доз вводять пацієнту при першій частоті (наприклад, однократно на тиждень, однократно кожні два тижні, однократно кожні три тижні, однократно на місяць, однократно кожні два місяці і т. д.), з наступним введенням двох або більше підтримуючих доз пацієнту на менш частій основі. Наприклад, відповідно до цього аспекту винаходу, якщо навантажувальні дози вводять при частоті, що дорівнює, наприклад, один раз на місяць (наприклад, дві, три, чотири або більше навантажувальних доз, що вводяться один раз на місяць), тоді підтримуючі дози можуть вводитися пацієнту однократно кожні п'ять тижнів, однократно кожні шість тижнів, однократно кожні сім тижнів, однократно кожних вісім тижнів, однократно кожних десять тижнів, однократно кожних дванадцять тижнів і т. д.).

Діагностичні застосування антитіл

[0191] Антитіла проти PD-1 даного винаходу можуть застосовуватися для виявлення і/або вимірювання PD-1 у зразку, наприклад, для цілей діагностики. Декілька варіантів здійснення передбачають застосування одного або декількох антитіл даного винаходу в аналітичних тестах для виявлення захворювання або розладу, такого як злоякісне новоутворення, аутоімунне захворювання або хронічна вірусна інфекція. Ілюстративні діагностичні аналітичні тести для PD-1 можуть включати в себе, наприклад, контактування зразка, одержаного від пацієнта, з антитілом проти PD-1 винаходу, де антитіло проти PD-1 є міченим виявлюваною міткою або репортерною молекулою або застосовується як іммобілізований ліганд для селективного виділення PD-1 зі зразків пацієнта. Альтернативно, немічене антитіло проти PD-1 може застосовуватися в діагностичних додатках у комбінації з вторинним антитілом, яке саме є виявлюваною міченим. Виявлювана мітка або репортерна молекула може являти собою радіоактивний ізотоп, такий як <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S або <sup>125</sup>I; флуоресцентний або хемілюмінесцентний фрагмент, такий як ізоціанат флуоресцеїну або родамін; або фермент, такий як лужна фосфатаза, β-галактозидаза, пероксидаза хрому або люцифераза. Специфічні ілюстративні аналітичні тести, які можуть застосовуватися для виявлення або вимірювання PD-1 у зразку, включають фермент-зв'язаний імуносорбентний аналіз (ELISA), радіоімуннологічний аналіз (RIA) і сортування клітин з активованою флуоресценцією (FACS).

[0192] Зразки, які можуть застосовуватися в діагностичних аналітичних тестах на PD-1 відповідно до даного винаходу, включають будь-який зразок тканини або рідкого середовища, одержуваний від пацієнта, що містить виявлювані кількості або білка PD-1, або його фрагментів при нормальних або патологічних станах. Звичайно, рівні PD-1 у конкретному зразку, одержаному від здорового пацієнта (наприклад, пацієнта, не ураженого злоякісним новоутворенням або аутоімунним захворюванням), будуть вимірюватися, щоб спочатку установити вихідний або стандартний рівень PD-1. Цей вихідний рівень PD-1 може потім

порівнюватися з рівнями PD-1, вимірюваними в зразках, одержаних від індивідуумів з підозрою на стан, що належить до злоякісного новоутворення, або симптомами, асоційованими з таким станом.

[0193] Антитіла, специфічні до PD-1, можуть не містити додаткових міток або фрагментів або вони можуть містити N-кінцеву або C-кінцеву мітку або фрагмент. В одному варіанті здійснення, мітка або фрагмент являє собою біотин. В аналітичному тесті на зв'язування, розташування мітки (при її наявності) може визначати орієнтацію пептиду відносно поверхні, з якою пептид зв'язаний. Наприклад, якщо поверхня покрита авідином, пептид, що містить N-кінцевий біотин, буде орієнтований таким чином, що C-кінцева частина пептиду буде віддалена від поверхні.

[0194] Аспекти винаходу стосуються застосування розкритих антитіл як маркерів для прогнозування злоякісного новоутворення або аутоімунного розладу у пацієнтів. Антитіла даного винаходу можуть застосовуватися в діагностичних аналітичних тестах для оцінки прогнозування злоякісного новоутворення у пацієнта і для прогнозування виживаності.

#### ПРИКЛАДИ

[0195] Наступні приклади пропонуються, щоб, таким чином, надати рядовим фахівцям в даній галузі повне розкриття й опис того, як здійснити і застосувати способи і композиції винаходу, і не призначені для обмеження обсягу того, що автори вважають їх винаходом. Були зроблені спроби забезпечити точність відносно застосовуваних числових значень (наприклад, кількостей, температури і т. д.), але варто брати до уваги деякі експериментальні помилки і відхилення. Якщо не зазначено інакше, частини являють собою масові частини, молекулярна маса являє собою середню молекулярну масу, температура наводиться в градусах по шкалі Цельсія, кімнатна температура дорівнює приблизно 25 °C і тиск є атмосферним або близьким до атмосферного.

#### Приклад 1. Генерація людських антитіл до PD-1

[0196] Людські антитіла до PD-1 генерували, використовуючи фрагмент PD-1, що знаходиться в приблизному інтервалі амінокислот 25-170 з послідовності GenBank з обліковим номером NP\_005009.2 (SEQ ID NO: 327) зі зміною C93S. Імуноген вводили безпосередньо, з ад'ювантом, щоб стимулювати імунну відповідь, мишам VELOCIMMUNE®, що містять ДНК, кодує важкий ланцюг і каппа-область варіабельної області легкого ланцюга людського імуноглобуліну. Імунну відповідь антитіл реєстрували за допомогою PD-1-специфічного імунологічного аналізу. Коли досягали бажаної імунної відповіді, спленоцити збирали і гібридизували з клітинами мишачої мієломи, щоб зберегти їх життєздатність і утворити клітинні лінії гібридами. Клітинні лінії гібридами піддавали скринінгу і відбирали, щоб ідентифікувати клітинні лінії, які продукують PD-1-специфічні антитіла. З використанням даного методу і імуногена, описаного вище, були одержані декілька химерних антитіл проти PD-1 (тобто антитіл, які мають людські варіабельні домени і мишачі константні домени); ілюстративні антитіла, генеровані таким чином, були позначені як H1M7789N, H1M7799N, H1M7800N, H2M7780N, H2M7788N, H2M7790N, H2M7791N, H2M7794N, H2M7795N, H2M7796 і H2M7798N.

[0197] Антитіла проти PD-1 також ізолювали безпосередньо з антигенпозитивних В-клітин без гібридизації з клітинами мієломи, як описано в U.S. 2007/0280945A1, повністю спеціально включений в даний опис за допомогою посилання. З використанням цього методу одержали декілька повністю людських антитіл проти PD-1 (тобто антитіл, які мають людські варіабельні домени і людські константні домени); ілюстративні антитіла, генеровані таким чином, були позначені наступним чином: H4N9019P, H4xH9034P2, H4xH9035P2, H4xH9037P2, H4xH9045P2, H4xH9048P2, H4N9057P2, H4N9068P2, H4xH9119P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4xH9135P2, H4xH9145P2, H4xH8992P, H4xH8999P і H4xH9008P.

[0198] Біологічні властивості ілюстративних антитіл, генерованих відповідно до методів даного Прикладу, описані докладно в Прикладах, наведених нижче.

#### Приклад 2. Амінокислотні і нуклеотидні послідовності важкого ланцюга і варіабельної області легкого ланцюга

[0199] У Таблиці 1 наведені ідентифікатори амінокислотних послідовностей важкого ланцюга і варіабельних областей легкого ланцюга і CDR вибраних антитіл проти PD-1 винаходу. Ідентифікатори відповідних послідовностей нуклеїнових кислот наведені в Таблиці 2.

Таблиця 1

## Ідентифікатори амінокислотних послідовностей

Позначення антитіла	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M7789N	2	4	6	8	10	12	14	16
H1M7799N	18	20	22	24	26	28	30	32
H1M7800N	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M7780N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M7788N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M7790N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M7791N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M7794N	114	116	118	120	122	124	126	128
H2M7795N	130	132	134	136	138	140	142	144
H2M7796N	146	148	150	152	154	156	158	160
H2M7798N	162	164	166	168	170	172	174	176
H4H9019P	178	180	182	184	186	188	190	192
H4xH9034P2	194	196	198	200	202	204	206	208
H4xH9035P2	210	212	214	216	202	204	206	208
H4xH9037P2	218	220	222	224	202	204	206	208
H4xH9045P2	226	228	230	232	202	204	206	208
H4xH9048P2	234	236	238	240	202	204	206	208
H4H9057P2	242	244	246	248	202	204	206	208
H4H9068P2	250	252	254	256	202	204	206	208
H4xH9119P2	258	260	262	264	202	204	206	208
H4xH9120P2	266	268	270	272	202	204	206	208
H4xH9128P2	274	276	278	280	202	204	206	208
H4xH9135P2	282	284	286	288	202	204	206	208
H4xH9145P2	290	292	294	296	202	204	206	208
H4xH8992P	298	300	302	304	186	188	190	192
H4xH8999P	306	308	310	312	186	188	190	192
H4xH9008P	314	316	318	320	186	188	190	192

Таблиця 2

## Ідентифікатори послідовностей нуклеїнових кислот

Позначення антитіла	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M7789N	1	3	5	7	9	11	13	15
H1M7799N	17	19	21	23	25	27	29	31
H1M7800N	33	35	37	39	41	43	45	47
H2M7780N	49	51	53	55	57	59	61	63
H2M7788N	65	67	69	71	73	75	77	79
H2M7790N	81	83	85	87	89	91	93	95
H2M7791N	97	99	101	103	105	107	109	111
H2M7794N	113	115	117	119	121	123	125	127
H2M7795N	129	131	133	135	137	139	141	143
H2M7796N	145	147	149	151	153	155	157	159
H2M7798N	161	163	165	167	169	171	173	175
H4H9019P	177	179	181	183	185	187	189	191
H4xH9034P2	193	195	197	199	201	203	205	207

## Продовження Таблиці 2

H4xH9035P2	209	211	213	215	201	203	205	207
H4xH9037P2	217	219	221	223	201	203	205	207
H4xH9045P2	225	227	229	231	201	203	205	207
H4xH9048P2	233	235	237	239	201	203	205	207
H4H9057P2	241	243	245	247	201	203	205	207
H4H9068P2	249	251	253	255	201	203	205	207
H4xH9119P2	257	259	261	263	201	203	205	207
H4xH9120P2	265	267	269	271	201	203	205	207
H4xH9128P2	273	275	277	279	201	203	205	207
H4xH9135P2	281	283	285	287	201	203	205	207
H4xH9145P2	289	291	293	295	201	203	205	207
H4xH8992P	297	299	301	303	185	187	189	191
H4xH8999P	305	307	309	311	185	187	189	191
H4xH9008P	313	315	317	319	185	187	189	191

[0200] Антитіла типовим чином іменуються в даному описі згідно з наступною номенклатурою: приставка Fc (наприклад, "H4xH", "H1M", "H2M" і т. д.), з наступним числовим ідентифікатором (наприклад, "7789", "7799" і т. д., як показано в Таблиці 1), з наступним суфіксом "P", "P2", "N" або "B". Таким чином, відповідно до даної номенклатури, антитіло може іменуватися в даному описі як, наприклад, "H1H7789N", "H1M7799N", "H2M7780N" і т. д. Приставки H4xH, H1M, H2M і H2aM у позначеннях антитіла, застосовувані в даному описі, 5 указують на конкретний ізотип області Fc антитіла. Наприклад, антитіло "H4xH" має Fc людського IgG4 з 2 або більше змінами амінокислот, як розкрито в US 20100331527, антитіло "H1M" має Fc мишачого IgG1 і антитіло "H2M" має Fc мишачого IgG2 (ізотип a або b) (усі варіабельні області повністю є людськими, як позначено першою 'H' у позначенні антитіла). Як 10 буде зрозуміло рядовому фахівцю в даній галузі, антитіло, що має конкретний ізотип Fc, може бути перетворене в антитіло з відмінним ізотипом Fc (наприклад, антитіло з Fc мишачого IgG1 може бути перетворене в антитіло з людським IgG4 і т. д.), але при будь-якій події, варіабельні домени (що включають CDR) - які зазначені за допомогою числових ідентифікаторів, показаних у Таблиці 1, - будуть залишатися такими ж і очікується, що властивості зв'язування з 15 анетигеном будуть ідентичними або по суті аналогічними, незалежно від природи домену Fc.

[0201] У деяких варіантах здійснення, вибрані антитіла з Fc мишачого IgG1 були перетворені в антитіла з Fc людського IgG4. В одному варіанті здійснення, домен Fc IgG4 містить мутацію 20 серину в пролін у шарнірній області (S108P) для ініціації стабілізації димеру. У Таблиці 3 наведені ідентифікатори амінокислотних послідовностей послідовностей важкого ланцюга і легкого ланцюга вибраних антитіл проти PD-1 з Fc людського IgG4.

Таблиця 3

Позначення антитіла	SEQ ID NO:	
	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг
H4H7798N	330	331
H4H7795N2	332	333
H4H9008P	334	335
H4H9048P2	336	337

[0202] Кожна послідовність важкого ланцюга в Таблиці 3 містила варіабельну область (V<sub>H</sub> або HCVR; що містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3) і константну область (що містить домени C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 і C<sub>H</sub>3). Кожна послідовність легкого ланцюга в Таблиці 3 містила варіабельну область (V<sub>L</sub> або LCVR; що містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3) і константну область (C<sub>L</sub>). SEQ ID NO: 330 25 містила HCVR, що містить амінокислоти 1-117, і константну область, що містить амінокислоти 118-444. SEQ ID NO: 331 містила LCVR, що містить амінокислоти 1-107, і константну область, що містить амінокислоти 108-214. SEQ ID NO: 332 містила HCVR, що містить амінокислоти 1-122, і константну область, що містить амінокислоти 123-449. SEQ ID NO: 333 містила LCVR, що 30 містить амінокислоти 1-107, і константну область, що містить амінокислоти 108-214. SEQ ID NO: 334 містила HCVR, що містить амінокислоти 1-119, і константну область, що містить амінокислоти 120-446. SEQ ID NO: 335 містила LCVR, що містить амінокислоти 1-108, і 35

константну область, що містить амінокислоти 109-215. SEQ ID NO: 336 містила HCVR, що містить амінокислоти 1-121, і константну область, що містить амінокислоти 122-448. SEQ ID NO: 337 містила LCVR, що містить амінокислоти 1-108, і константну область, що містить амінокислоти 109-215.

5 Приклад 3. Зв'язування антитіла з PD-1, визначене за допомогою поверхневого плазмонного резонансу

[0203] Константи швидкості асоціації і дисоціації при зв'язуванні ( $k_a$  і  $k_d$ , відповідно), рівноважні константи дисоціації і періоди половинної дисоціації ( $K_D$  і  $t_{1/2}$ , відповідно) для зв'язування антигену з очищеними антитілами проти PD-1 визначали з використанням аналітичного біосенсорного тесту методом поверхневого плазмонного резонансу в режимі реального часу на приладі Biacore 4000 або Biacore T200. Поверхню датчика Biacore дериватизували або поліклональними кролячими проти мишачих антитілами (GE, #BR-1008-38), або моноклональними мишачими проти людських Fc антитілами (GE, #BR-1008-39) для захоплення приблизно 100-900 RU моноклональних антитіл проти PD-1, експресованих разом або з мишачим Fc, або з людським Fc, відповідно. Реагенти на PD-1, тестовані на зв'язування з антитілами проти PD-1, включали рекомбінантний PD-1 людини, експресований з С-кінцевою мус-мус-гексагістидиновою міткою (hPD-1-MMH; SEQ ID NO: 321), рекомбінантний PD-1 мавпака, експресований з С-кінцевою мус-мус-гексагістидиновою міткою (MfPD-1-MMH; SEQ ID NO: 322), димер рекомбінантного PD-1 людини, експресований або з С-кінцевою Fc-міткою мишачого IgG2a (hPD-1-mFc; SEQ ID NO: 323) або з С-кінцевим Fc людського IgG1 (hPD-1-hFc; SEQ ID NO: 324), і PD-1 мавпи з mFc (SEQ ID NO: 329). Різні концентрації реагентів на PD-1 в інтервалі від 200 нМ до 3,7 нМ інjektували над поверхню захоплення моноклонального антитіла проти PD-1 при швидкості потоку, що дорівнює 30 мкл/хв. на Biacore 4000 або 50 мкл/хв. на Biacore T200. Зв'язування реагентів на PD-1 із захопленими моноклональними антитілами реєстрували протягом 3-5 хвилин, у той час як їх дисоціацію з антитіл реєстрували протягом 7-10 хвилин у рухомому буфері HBST (0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05 % об./об. поверхнево-активної речовини P20). Експерименти проводили при 25 °C і 37 °C. Кінетичні константи швидкості асоціації ( $k_a$ ) і дисоціації ( $k_d$ ) визначали за допомогою обробки й апроксимації даних до моделі зв'язування 1:1 з використанням програмного забезпечення Scrubber 2.0c для підбору апроксимуючої кривої. Рівноважні константи дисоціації при зв'язуванні ( $K_D$ ) і періоди половинної дисоціації ( $t_{1/2}$ ) потім обчислювали з кінетичних констант швидкості як:  $K_D$  (M) =  $k_d/k_a$  і  $t_{1/2}$  (хв.) =  $[\ln 2 / (60 \cdot k_d)]$ . Параметри кінетики зв'язування для різних моноклональних антитіл проти PD-1, що зв'язуються з різними реагентами на PD-1 при 25C і 37 °C, зведені в Таблиці 4-11.

35

Таблица 4

Параметри кінетики зв'язування моноклональних антитіл проти PD-1, що зв'язуються з людським PD-1-MMH при 25 °C

Антитіло	$k_a$ (1/Mc)	$k_d$ (1/c)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (хв.)
H2aM7780N	9,32E+03	3,59E-04	3,85E-08	32
H2aM7788N	1,97E+04	3,88E-04	1,96E-08	30
H1M7789N	2,53E+04	5,31E-05	2,10E-09	218
H2aM7790N	4,63E+04	8,23E-04	1,78E-08	14
H2aM7791N	3,01E+04	7,06E-04	2,34E-08	16
H2aM7794N	5,50E+04	2,12E-03	3,80E-08	5,4
H2aM7795N	4,91E+04	1,15E-03	2,35E-08	10
H2aM7796N	6,73E+03	1,93E-03	2,86E-07	6,0
H2aM7798N	1,32E+05	3,06E-04	2,31E-09	38
H1M7799N	5,04E+04	1,23E-02	2,44E-07	0,9
H1M7800N	5,88E+04	9,47E-03	1,61E-07	1,2
H4H9019P	2,05E+04	8,08E-04	3,94E-08	14
H4xH9034P	1,02E+05	1,49E-03	1,45E-08	7,8
H4xH9035P	1,03E+05	4,75E-04	4,62E-09	24
H4xH9037P	7,32E+04	7,95E-04	1,09E-08	15
H4xH9045P	5,40E+04	4,03E-03	7,46E-08	2,9

Продовження Таблиці 4

H4xH9048P2	1,37E+05	1,23E-03	8,95E-09	9,4
H4H9057P2	4,60E+04	1,34E-02	2,91E-07	0,9
H4H9068P2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4xH9119P2	7,84E+04	1,22E-03	1,56E-08	9,5
H4xH9120P2	3,32E+04	9,98E-04	3,01E-08	12
H4xH9128P2	4,95E+04	7,19E-04	1,45E-08	16
H4xH9135P2	1,17E+05	1,20E-03	1,02E-08	10
H4xH9145P2	3,47E+04	1,34E-03	3,85E-08	8,6
H4xH8992P	1,50E+05	2,13E-02	1,41E-07	0,5
H4xH8999P	2,83E+05	1,23E-03	4,33E-09	9,4
H4xH9008P	4,29E+04	1,33E-03	3,10E-08	8,7
H4H7795N2	6,35E+04	1,48E-03	2,33E-08	8
H4H7798N	1,47E+05	4,43E-04	3,01E-09	26

\*NB вказує на те, що, при експериментальних умовах, реагент на PD-1 не зв'язувався з захопленим моноклональним антитілом проти PD-1.

Таблиця 5

Параметри кінетики зв'язування моноклональних антитіл  
проти PD-1, що зв'язуються з людським PD-1-MMH при 37 °C

Антитіло	$K_a$ (1/Mc)	$K_d$ (1/c)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (хв.)
H2aM7780N	2,72E+04	1,52E-03	5,58E-08	7,6
H2aM7788N	2,88E+04	1,49E-03	5,19E-08	7,7
H1M7789N	4,53E+04	2,95E-04	6,52E-09	39
H2aM7790N	6,13E+04	5,20E-03	8,49E-08	2,2
H2aM7791N	4,18E+04	2,24E-03	5,35E-08	5,2
H2aM7794N	1,20E+05	7,92E-03	6,61E-08	1,5
H2aM7795N	6,75E+04	4,58E-03	6,78E-08	2,5
H2aM7796N	1,09E+04	1,65E-02	1,51E-06	0,7
H2aM7798N	1,73E+05	6,56E-04	3,79E-09	18
H1M7799N	7,94E+04	4,25E-02	5,36E-07	0,3
H1M7800N	7,83E+04	3,99E-02	5,10E-07	0,3
H4H9019P	1,20E+04	5,44E-03	4,53E-07	2,1
H4xH9034P	2,79E+05	1,12E-02	4,02E-08	1,0
H4xH9035P	2,98E+05	4,26E-03	1,43E-08	2,7
H4xH9037P	2,26E+05	6,68E-03	2,95E-08	1,7
H4xH9045P	8,04E+04	5,32E-02	6,62E-07	0,2
H4xH9048P2	3,70E+05	8,60E-03	2,32E-08	1,3
H4H9057P2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H9068P2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4xH9119P2	2,40E+05	1,04E-02	4,35E-08	1,1
H4xH9120P2	6,88E+04	7,01E-03	1,02E-07	1,6
H4xH9128P2	1,04E+05	4,36E-03	4,20E-08	2,6

Продовження Таблиці 5

H4xH9135P2	4,18E+05	1,11E-02	2,66E-08	1,0
H4xH9145P2	1,31E+05	1,23E-02	9,40E-08	0,9
H4xH8992P	IC*	IC*	IC*	IC*
H4xH8999P	5,99E+05	9,42E-03	1,57E-08	1,2
H4xH9008P	1,29E+05	8,09E-03	6,26E-08	1,4
H4H7795N2	6,41E+04	6,64E-03	1,04E-07	1,7
H4H7798N	2,27E+05	1,70E-03	7,48E-09	7

\*NB вказує на те, що, при експериментальних умовах, реагент на PD-1 не зв'язувався з захопленим моноклональним антитілом проти PD-1. IC вказує на те, що, при експериментальних умовах, зв'язування з PD-1 є неостаточним.

Таблиця 6

Параметри кінетики зв'язування моноклональних антитіл проти PD-1, що зв'язуються з димером людського PD-1 (людський PD-1-mFc або людський PD-1-hFc) при 25 °C

Антитіло	$k_a$ (1/Mc)	$k_d$ (1/c)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (хв.)
H2aM7780N	4,21E+04	9,94E-06	2,36E-10	1162
H2aM7788N	8,94E+04	2,82E-05	3,15E-10	410
H1M7789N	3,91E+04	4,31E-05	1,10E-09	268
H2aM7790N	1,86E+05	3,02E-05	1,62E-10	383
H2aM7791N	4,05E+04	1,01E-04	2,49E-09	114
H2aM7794N	1,79E+05	1,06E-04	5,93E-10	109
H2aM7795N	1,38E+05	3,14E-05	2,27E-10	368
H2aM7796N	2,61E+04	8,67E-05	3,32E-09	133
H2aM7798N	3,50E+05	2,29E-05	6,55E-11	505
H1M7799N	2,38E+05	8,55E-05	3,60E-10	135
H1M7800N	1,52E+05	7,72E-05	5,09E-10	150
H4H9019P	4,38E+04	8,61E-05	1,97E-09	134
H4xH9034P	2,15E+05	1,51E-04	7,01E-10	77
H4xH9035P	2,01E+05	1,03E-04	5,13E-10	112
H4xH9037P	1,50E+05	1,29E-04	8,62E-10	89
H4xH9045P	9,13E+04	1,60E-04	1,75E-09	72
H4xH9048P2	2,36E+05	1,88E-04	7,98E-10	61
H4H9057P2	1,01E+05	1,77E-04	1,75E-09	65
H4H9068P2	4,72E+04	2,80E-03	5,94E-08	4
H4xH9119P2	1,63E+05	1,62E-04	9,92E-10	71
H4xH9120P2	6,52E+04	1,19E-04	1,82E-09	97
H4xH9128P2	8,37E+04	1,33E-04	1,59E-09	87
H4xH9135P2	2,12E+05	1,38E-04	6,51E-10	84
H4xH9145P2	6,58E+04	1,58E-04	2,40E-09	73
H4xH8992P	2,35E+05	1,60E-04	6,80E-10	72
H4xH8999P	5,55E+05	1,20E-04	2,17E-10	96
H4xH9008P	3,52E+04	2,80E-05	7,96E-10	412
H4H7795N2	1,50E+05	9,25E-05	6,15E-10	125
H4H7798N	4,41E+05	5,40E-05	1,22E-10	214



Таблиця 7

Параметри кінетики зв'язування моноклональних антитіл проти PD-1, що зв'язуються з димером людського PD-1 (людський PD-1-mFc або людський PD-1-hFc) при 37 °C

Антитіло	$k_a$ (1/Mc)	$k_d$ (1/c)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (хв.)
H2aM7780N	9,94E+04	2,29E-05	2,30E-10	505
H2aM7788N	1,31E+05	2,13E-05	1,63E-10	542
H1M7789N	1,09E+05	$\leq 1,0E-05$	$\leq 9,17E-11$	$\geq 1155$
H2aM7790N	2,01E+05	8,49E-05	4,22E-10	136
H2aM7791N	4,98E+04	1,79E-04	3,59E-09	65
H2aM7794N	4,68E+05	2,11E-04	4,52E-10	55
H2aM7795N	1,65E+05	6,13E-05	3,71E-10	188
H2aM7796N	2,21E+04	4,34E-04	1,96E-08	27
H2aM7798N	4,90E+05	1,40E-05	2,80E-11	825
H1M7799N	4,41E+05	1,81E-04	4,11E-10	64
H1M7800N	4,00E+05	1,81E-04	4,50E-10	64
H4H9019P	7,17E+04	1,95E-04	2,71E-09	59
H4xH9034P	3,02E+05	6,30E-04	2,09E-09	18
H4xH9035P	3,16E+05	5,54E-04	1,75E-09	21
H4xH9037P	2,63E+05	9,21E-04	3,50E-09	13
H4xH9045P	2,14E+05	1,10E-03	5,13E-09	11
H4xH9048P2	3,61E+05	1,10E-03	3,05E-09	10
H4H9057P2	2,33E+05	2,11E-03	9,07E-09	5
H4H9068P2	9,69E+04	1,20E-02	1,24E-07	1
H4xH9119P2	2,40E+05	9,09E-04	3,80E-09	13
H4xH9120P2	8,08E+04	4,82E-04	5,96E-09	24
H4xH9128P2	1,86E+05	6,86E-04	3,68E-09	17
H4xH9135P2	3,10E+05	7,02E-04	2,27E-09	16
H4xH9145P2	1,60E+05	5,71E-04	3,58E-09	20
H4xH8992P	3,49E+05	1,02E-03	2,91E-09	11
H4xH8999P	7,57E+05	4,51E-04	5,96E-10	26
H4xH9008P	5,52E+04	$\leq 1,0E-05$	$\leq 1,81E-10$	$\geq 1155$
H4H7795N2	1,60E+05	2,64E-04	1,65E-09	44
H4H7798N	6,60E+05	1,15E-04	1,75E-10	100

Таблиця 8

Параметри кінетики зв'язування моноклональних антитіл проти PD-1, що зв'язуються з MfPD-1-MMH при 25 °C

Антитіло	$k_a$ (1/Mc)	$k_d$ (1/c)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (хв.)
H2aM7780N	1,00E+04	3,15E-04	3,15E-08	37
H2aM7788N	8,63E+03	6,62E-04	7,66E-08	17
H1M7789N	1,55E+04	1,23E-04	7,89E-09	94
H2aM7790N	3,11E+04	9,37E-04	3,01E-08	12
H2aM7791N	1,61E+04	5,53E-04	3,44E-08	21
H2aM7794N	3,60E+04	5,99E-03	1,66E-07	1,9
H2aM7795N	4,44E+04	8,89E-04	2,01E-08	13
H2aM7796N	NB*	NB*	NB*	NB*
H2aM7798N	8,72E+04	3,93E-04	4,50E-09	29

Продовження Таблиці 8

H1M7799N	5,78E+04	1,30E-02	2,24E-07	0,9
H1M7800N	5,89E+04	1,04E-02	1,76E-07	1,1
H4H9019P	1,94E+04	8,33E-04	4,29E-08	14
H4xH9034P	9,61E+04	2,69E-03	2,80E-08	4,3
H4xH9035P	9,36E+04	4,34E-04	4,64E-09	27
H4xH9037P	6,99E+04	9,15E-04	1,31E-08	13
H4xH9045P	6,25E+04	7,05E-03	1,13E-07	1,6
H4xH9048P2	1,28E+05	8,97E-04	7,00E-09	13
H4H9057P2	3,46E+04	1,91E-02	5,51E-07	0,6
H4H9068P2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4xH9119P2	7,50E+04	1,66E-03	2,22E-08	6,9
H4xH9120P2	3,17E+04	1,08E-03	3,41E-08	11
H4xH9128P2	3,68E+04	6,49E-04	1,77E-08	18
H4xH9135P2	1,24E+05	1,31E-03	1,06E-08	8,8
H4xH9145P2	2,86E+04	1,24E-03	4,31E-08	9,3
H4xH8992P	1,88E+05	3,76E-02	2,00E-07	0,3
H4xH8999P	4,29E+05	1,33E-03	3,09E-09	8,7
H4xH9008P	1,05E+05	2,49E-03	2,38E-08	4,6
H4H7795N2	6,59E+04	1,48E-03	2,24E-08	8
H4H7798N	1,43E+05	5,51E-04	3,86E-09	21

\*NB вказує на те, що, при експериментальних умовах, реагент на PD-1 не зв'язувався з захопленням моноклональним антитілом проти PD-1.

Таблиця 9

Параметри кінетики зв'язування моноклональних антитіл проти PD-1,  
що зв'язуються з MfPD-1-MMH при 37 °C

Антитіло	$k_a$ (1/Mc)	$k_d$ (1/c)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (хв.)
H2aM7780N	2,29E+04	1,38E-03	6,05E-08	8,3
H2aM7788N	1,88E+04	3,28E-03	1,74E-07	3,5
H1M7789N	4,79E+04	4,08E-04	8,50E-09	28
H2aM7790N	2,55E+04	6,93E-03	2,71E-07	1,7
H2aM7791N	3,79E+04	1,91E-03	5,05E-08	6,0
H2aM7794N	6,66E+04	2,01E-02	3,02E-07	0,6
H2aM7795N	6,47E+04	3,89E-03	6,02E-08	3,0
H2aM7796N	NB*	NB*	NB*	NB*
H2aM7798N	1,42E+05	9,93E-04	7,00E-09	12
H1M7799N	8,80E+04	4,67E-02	5,30E-07	0,2
H1M7800N	8,40E+04	4,43E-02	5,27E-07	0,3
H4H9019P	2,14E+04	7,63E-03	3,56E-07	1,5
H4xH9034P	2,83E+05	2,47E-02	8,73E-08	0,5
H4xH9035P	3,06E+05	4,29E-03	1,40E-08	2,7
H4xH9037P	2,22E+05	8,80E-03	3,97E-08	1,3
H4xH9045P	1,40E+04	1,05E-01	7,54E-06	0,1
H4xH9048P2	4,15E+05	6,97E-03	1,68E-08	1,7
H4H9057P2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H9068P2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4xH9119P2	2,40E+05	1,23E-02	5,14E-08	0,9

Продовження Таблиці 9

H4xH9120P2	6,98E+04	7,48E-03	1,07E-07	1,5
H4xH9128P2	9,06E+04	4,18E-03	4,61E-08	2,8
H4xH9135P2	4,62E+05	1,34E-02	2,89E-08	0,9
H4xH9145P2	1,71E+05	1,43E-02	8,37E-08	0,8
H4xH8992P	IC*	IC*	IC*	IC*
H4xH8999P	9,83E+05	9,26E-03	9,41E-09	1,2
H4xH9008P	5,86E+05	1,38E-02	2,35E-08	0,8
H4H7795N2	7,80E+04	6,89E-03	8,83E-08	1,7
H4H7798N	2,13E+05	2,23E-3	1,05E-08	5

\*NB вказує на те, що, при експериментальних умовах, реагент на PD-1 не зв'язувався з захопленим моноклональним антитілом проти PD-1. IC вказує на те, що, при експериментальних умовах, зв'язування з PD-1 є неостаточним.

Таблиця 10

Параметри кінетики зв'язування моноклональних антитіл проти PD-1, що зв'язуються з димером PD-1 мавпи (PD-1-mFc мавпи) при 25 °C

Антитіло	Кількість захопленого mAb (RU)	100 нМ зв'язаного PD-1-mFc мавпи (RU)	$K_a$ (1/Mc)	$k_d$ (1/c)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (хв.)
H4H9019P	116	31	4,55E+04	8,96E-05	1,97E-09	129
H4xH9034P	215	95	2,03E+05	1,66E-04	8,18E-10	70
H4xH9035P	153	78	2,16E+05	9,96E-05	4,60E-10	116
H4xH9037P	137	58	1,50E+05	1,37E-04	9,12E-10	84
H4xH9045P	202	78	9,78E+04	1,68E-04	1,72E-09	69
H4xH9048P2	227	115	2,43E+05	1,84E-04	7,54E-10	63
H4H9057P2	196	75	1,02E+05	3,03E-04	2,98E-09	38
H4H9068P2	178	17	5,70E+04	3,09E-03	5,42E-08	4
H4xH9119P2	209	83	1,63E+05	1,72E-04	1,05E-09	67
H4xH9120P2	195	52	5,84E+04	1,12E-04	1,91E-09	104
H4xH9128P2	175	64	7,87E+04	1,24E-04	1,57E-09	94
H4xH9135P2	150	74	2,38E+05	1,43E-04	6,02E-10	81
H4xH9145P2	304	84	7,24E+04	1,50E-04	2,08E-09	77
H4xH8992P	260	122	2,03E+05	2,51E-04	1,24E-09	46
H4xH8999P	217	126	5,50E+05	1,15E-04	2,10E-10	100
H4xH9008P	248	93	1,20E+05	5,77E-05	4,80E-10	200
H4H7795N2	204	60	1,60E+05	9,92E-05	6,21E-10	116
H4H7798N	223	93	4,49E+05	6,14E-05	1,37E-10	188

Таблиця 11

Параметри кінетики зв'язування моноклональних антитіл проти PD-1, що зв'язуються з димером PD-1 мавпи (PD-1-mFc мавпи) при 37 °C

Антитіло	Кількість захопленого mAb (RU)	100 нМ зв'язаного PD-1-mFc мавпи (RU)	$k_a$ (1/Mc)	$k_d$ (1/c)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (хв.)
H4H9019P	89	36	8,16E+04	2,59E-04	3,17E-09	45
H4xH9034P	184	81	3,07E+05	7,49E-04	2,44E-09	15
H4xH9035P	88	40	3,67E+05	6,23E-04	1,70E-09	19
H4xH9037P	55	24	2,80E+05	8,97E-04	3,21E-09	13
H4xH9045P	161	65	2,41E+05	1,36E-03	5,66E-09	8
H4xH9048P2	184	84	4,94E+05	1,13E-03	2,29E-09	10
H4H9057P2	105	28	1,61E+05	4,77E-03	2,96E-08	2,4
H4H9068P2	90	6	1,21E+05	1,05E-02	8,63E-08	1,1
H4xH9119P2	98	40	2,79E+05	8,85E-04	3,17E-09	13
H4xH9120P2	141	46	8,29E+04	5,02E-04	6,06E-09	23
H4xH9128P2	148	60	1,87E+05	8,16E-04	4,36E-09	14
H4xH9135P2	106	52	3,42E+05	7,94E-04	2,32E-09	15
H4xH9145P2	284	94	1,51E+05	6,09E-04	4,04E-09	19
H4xH8992P	206	86	3,50E+05	1,53E-03	4,38E-09	8
H4xH8999P	160	83	7,30E+05	5,10E-04	7,00E-10	23
H4xH9008P	216	98	2,04E+05	1,00E-05*	4,90E-11*	1155*
H4H7795N2	164	47	1,70E+05	2,90E-04	1,71E-09	40
H4H7798N	203	88	6,30E+05	1,27E-04	2,02E-10	91

\*Вказує на те, що, при використовуваних експериментальних умовах дисоціації, реагент на PD-1 не спостерігали і значення  $k_d$  вручну фіксували при 1,00E-05.

[0204] Як показано в Таблиці 4, при 25 °C, 28 з 29 антитіл проти PD-1 винаходу зв'язувалися з hPD-1-ММН зі значеннями  $K_D$  в інтервалі від 2,1 нМ до 291 нМ. Одне антитіло, H4H9068P2, не демонструвало якого-небудь вимірюваного зв'язування з hPD-1-ММН при 25 °C. Як показано в Таблиці 5, при 37 °C, 26 з 29 антитіл проти PD-1 винаходу зв'язувалися з hPD-1-ММН зі значеннями  $K_D$  в інтервалі від 3,79 нМ до 1,51 мкМ. Три антитіла винаходу не демонстрували якого-небудь переконливого зв'язування з hPD-1-ММН при 37 °C. Як показано в Таблиці 6, при 25 °C, усі 29 антитіл проти PD-1 винаходу зв'язувалися з білками димеру hPD-1 зі значеннями  $K_D$  в інтервалі від 65,5 пМ до 59,4 нМ. Як показано в Таблиці 7, при 37 °C, усі 27 антитіл винаходу проти PD-1 зв'язувалися з білками димеру hPD-1 зі значеннями  $K_D$  в інтервалі від 3,09 пМ до 551 нМ. Як показано в Таблиці 8, при 25 °C, 27 з 29 антитіл винаходу проти PD-1 зв'язувалися з MfPD-1-ММН зі значеннями  $K_D$  в інтервалі від 3,09 нМ до 551 нМ. Два антитіла винаходу не демонстрували якого-небудь переконливого зв'язування з MfPD-1-ММН при 25 °C. Як показано в Таблиці 9, при 37 °C, 25 з 29 антитіл винаходу проти PD-1 зв'язувалися з MfPD-1-ММН зі значеннями  $K_D$  в інтервалі від 7,00 нМ до 7,54 мкМ. Чотири антитіла винаходу не демонстрували якого-небудь переконливого зв'язування з MfPD-1-ММН при 37 °C. Як показано в Таблиці 10, при 25 °C, усі 18 тестованих антитіл проти PD-1 винаходу зв'язувалися з димером MfPD-1 зі значеннями  $K_D$  в інтервалі від 137 пМ до 54,2 нМ. Як показано в Таблиці 11, при 37 °C, усі 18 тестованих антитіл винаходу проти PD-1 зв'язувалися з димером MfPD-1 зі значеннями  $K_D$  в інтервалі від менше ніж 49 пМ до 86,3 нМ.

Приклад 4. Блокування зв'язування PD-1 з PD-L1, визначене за допомогою ELISA

[0205] Здатність антитіл проти PD-1 блокувати зв'язування PD-1 людини з його лігандом, PD-L1-рецептором, вимірювали, використовуючи три конкурентних формати сендвіч-ELISA. Димерні людські білки PD-L1, що складаються з частини позаклітинного домену людського PD-L1, експресованого або з С-кінцевою міткою людського Fc (hPD-L1-hFc; SEQ ID: 325), або з С-кінцевою міткою мишачого Fc (hPD-L1-mFc; SEQ ID: 326), або димерний людський PD-L2, що складається з позаклітинної області людського PD-L2, одержаний з С-кінцевою міткою людського Fc (hPD-L2-hFc; R&D Systems, #1224-PL), роздільно вносили при концентрації, що

дорівнює 2 мкг/мл, у PBS у 96-ямковий планшет для мікротитрування і залишали протягом ночі при 4 °С. Ділянки неспецифічного зв'язування послідовно блокували, використовуючи 0,5 % (мас./об.) розчин BSA у PBS. У першому конкурентному форматі, постійну концентрацію, що дорівнює 1,5 нМ, димерного білка PD-1 людини, що містить позаклітинний домен PD-1 людини, експресований з С-кінцевою міткою мишачого Fc (hPD-1-mFc; SEQ ID: 323), додавали до серійних розведень антитіл проти PD-1 або антитіл ізотипічного контролю таким чином, що кінцеві концентрації антитіл знаходилися в інтервалі від 0 до 200 нМ. В другому конкурентному форматі, постійну концентрацію, що дорівнює 200 пМ, димерного біотинільованого білка PD-1 людини, що містить позаклітинний домен PD-1 людини, який експресувався з С-кінцевою міткою людського Fc (biot-hPD-1-hFc; SEQ ID: 323), аналогічно додавали до серійних розведень антитіл проти PD-1 або антитіл ізотипічного контролю при кінцевих концентраціях антитіл в інтервалі від 0 до 50 нМ. У третьому конкурентному форматі, постійну концентрацію, що дорівнює 100 пМ, димерного білка hPD-1-mFc аналогічно додавали до серійних розведень антитіл проти PD-1 або ізотипічних контролів при кінцевих концентраціях антитіл в інтервалі від 0 до 100 нМ. Ці комплекси антитіло-білок потім інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі (КТ). Комплекси антитіло-білок з 1,5 нМ константної hPD-1-mFc переносили в планшети для мікротитрування, покриті hPD-L1-hFc, комплекси антитіло-білок з 200 пМ константної biot-hPD-1-hFc переносили в планшети, покриті hPD-L1-mFc, і комплекси антитіло-білок з 100 пМ константної hPD-1-mFc переносили в планшети для мікротитрування, покриті hPD-L2-hFc. Після інкубації протягом 1 години при КТ, ямки промивали, і зв'язаний із планшетом hPD-1-mFc виявляли разом з поліклональним антитілом проти mFc, кон'югованим з пероксидазою хрому (HRP) (Jackson ImmunoResearch Inc., #115-035-164), і зв'язаний із планшетом biot-hPD-1-hFc виявляли разом зі стрептавідином, кон'югованим з HRP (Thermo Scientific, #N200). Зразки проявляли розчином TMB (BD Biosciences, #51-2606KC і #51-2607KC) для одержання колориметричної реакції і потім проявлення кольору стабілізували додаванням 1М сірчаної кислоти перед виміром поглинання при 450 нм на зчитувальному пристрої для планшетів Victor X5. Аналіз даних проводили, використовуючи сигмовидну модель доза-відповідь у програмному забезпеченні Prism™ (GraphPad). Розраховане значення IC<sub>50</sub>, визначуване як концентрація антитіла, необхідна для зниження на 50 % зв'язування PD-1 людини з людськими PD-L1 або PD-L2, застосовували як показник активності блокування потенційної активності. Відсоток максимальної блокади розраховували як міру вимірювання здатності антитіла повністю блокувати зв'язування PD-1 людини з людськими PD-L1 або PD-L2 на планшеті, як визначають по дозовій кривій. Даний відсоток максимального блокування розраховували за допомогою віднімання з 100 % відношення зниження сигналу, спостережуваного в присутності найвищої тестованої концентрації для кожного антитіла, відносно відмінності між сигналом, спостережуваним для зразка PD-1 людини, що не містить антитіла проти PD-1 (0 % блокування), і фонового сигналу від HRP-кон'югованого вторинного антитіла окремо (100 % блокування).

[0206] Відсоткове максимальне блокування і розраховані значення IC<sub>50</sub> для блокування антитілом, більшого, ніж 35 % від сигналу зв'язування hPD-1, показані в Таблицях 12-14. Антитіла, які показали зниження сигналу зв'язування hPD-1, що дорівнює 35 % або менше, визначали як неблокатори. Антитіла, які показали збільшення, що дорівнює 35 % або більше, сигналу зв'язування PD-1 людини, характеризували як неблокатори/енхансери. Теоретична нижня межа тесту, визначувана як мінімальна концентрація антитіла, теоретично необхідна для заняття 50 % ділянок зв'язування PD-1 людини в тесті, складає 0,75 нМ для формату з використанням постійного 1,5 нМ hPD-1-mFc, 100 пМ для формату з використанням постійного 200 пМ біот-hPD-1-hFc і 50 пМ для формату з використанням постійного 100 пМ hPD-1-mFc, указуючи на те, що більш низькі розраховані значення IC<sub>50</sub> можуть не представляти кількісну ділянку зв'язування білок-антитіло. З цієї причини, антитіла з розрахованими значеннями IC<sub>50</sub>, меншими ніж 0,75 нМ, у тесті з постійним hPD-1-mFc і покриттям hPD-L1, меншим ніж 100 пМ, у тесті з постійним біот-hPD-1-hFc і покриттям hPD-L1, меншими ніж 50 пМ, у тесті з постійним hPD-1-mFc і покриттям hPD-L2 наведені в Таблицях 12-14 як <7,5E-10M, <1,0E-10M і <5,0E-11M, відповідно.

Таблиця 12

Блокування зв'язування PD-1 людини з  
людським PD-L1 під дією антитіл проти PD-1 за результатами ELISA

Антитіло	Блокування зв'язування 1,5 нМ hPD-1-mFc з hPD-L1-hFc, IC <sub>50</sub> (М)	Блокування зв'язування 200 нМ антитіла 1,5 нМ hPD-1-mFc з hPD-L1- hFc, % блокування
H4H9019P	1,3E-09	98
H4xH9034P	5,1E-10*	98
H4xH9045P	2,8E-10*	98
H4xH9048P2	3,3E-09	67
H4xH9120P2	1,0E-09	98
H4xH9128P2	6,4E-10*	98
H4xH9035P	6,2E-10*	99
H4xH9135P2	1,1E-09	97
H4xH9145P2	9,3E-10	90
H4xH9119P2	2,0E-10*	78
H4H9057P2	1,9E-10*	98
H4H9068P2	NBI/енхансер	-142
H4xH9037P	8,9E-10	100
H2aM7780N	6,9E-10*	94
H2aM7788N	2,2E-10*	74
H1M7789N	NBI/енхансер	-170
H2aM7790N	1,5E-09	74
H2aM7791N	NBI/енхансер	-154
H2aM7794N	1,1E-09	95
H2aM7795N2	8,6E-10	93
H2aM7796N	NBI	-20
H2aM7798N	6,8E-10*	93
H1M7799N	2,2E-10*	82
H1M7800N	6,0E-10*	83
H4xH8992P	1,3E-09	93
H4xH8999P	1,3E-09	88
H4xH9008P	2,4E-09	88
Ізотипічний контроль 1	NBI	-3
Ізотипічний контроль 2	NBI	-34
Ізотипічний контроль 2	NBI	-7
Ізотипічний контроль 2	NBI	-16

Теоретична нижня межа тесту: для блокування ELISA з постійним hPD-1-mFc і покриттям hPD-L1 складає 7,5E-10M;

- 5 (\*) - нижче теоретичної нижньої межі тесту;  
NT- не тестували; NBI - неблокатор;  
NBI/енхансер - неблокатор/енхансер; IC - непереконливий.

Таблиця 13

Блокування зв'язування біотинільованого PD-1 людини  
з людським PD-L1 антитілами проти PD-1 за даними ELISA

Антитіло	Блокування 200 пМ зв'язування біот-hPD-1-hFc з hPD-L1-mFc, IC <sub>50</sub> (M)	Блокування 50 нМ антитіла зв'язування 200 пМ біот-hPD-1-hFc з hPD-L1-mFc, % блокування
H4H9019P	6,4E-10	97
H4xH9034P	6,6E-11*	96
H4xH9045P	1,3E-10	95
H4xH9048P2	IC	76
H4xH9120P2	3,9E-10	96
H4xH9128P2	1,9E-10	97
H4xH9035P	8,0E-11*	95
H4xH9135P2	1,5E-10	96
H4xH9145P2	3,5E-10	97
H4xH9119P2	8,2E-11*	96
H4H9057P2	NBI/енхансер	-57
H4H9068P2	NBI/енхансер	-43
H4xH9037P	7,8E-11*	95
H2aM7780N	9,1E-11*	100
H2aM7788N	6,5E-11*	100
H1M7789N	NBI	9
H2aM7790N	1,9E-10	99
H2aM7791N	NBI/енхансер	-45
H2aM7794N	2,3E-10	99
H2aM7795N2	6,9E-11*	99
H2aM7796N	1,3E-09	60
H2aM7798N	7,3E-11*	100
H1M7799N	5,9E-11*	100
H1M7800N	6,5E-11*	99
H4xH8992P	1,6E-10	97
H4xH8999P	1,8E-10	92
H4xH9008P	1,3E-09	93
Ізотипічний контроль 1	NBI	19
Ізотипічний контроль 2	NBI	35
Ізотипічний контроль 2	NBI	-18
Ізотипічний контроль 2	NBI	-11

Теоретична нижня межа тесту: для блокування за даними ELISA з постійним біот-hPD-1-mFc і покриттям hPD-L1 складає 1,0E-10M;

5

(\*) - нижче теоретичної нижньої межі тесту;

NT- не тестували; NBI - неблокатор;

NBI/енхансер - неблокатор/енхансер; IC - неостаточний.

Блокування зв'язування PD-1 людини з людським  
PD-L2 антитілами проти PD-1 за даними ELISA

Антитіло	Блокування 100 пМ зв'язування hPD-1-mFc з hPD-L2-hFc, IC <sub>50</sub> (М)	Блокування 100 нМ антитіла зв'язування 100 пМ hPD-1-mFc з hPD- L2-hFc, % блокування
H4xH9048P2	1,4E-10	98
H2aM7795N2	2,6E-10	100
H2aM7798N	1,3E-10	100
H4xH9008P	1,3E-09	94
Ізотипічний контроль 2	NBI	-27

Теоретична нижня межа тесту: блокування ELISA з використанням постійного hPD-1-mFc і покриття hPD-L2 складає 5,0E-11M;

5 NBI - неблокатор.

[0207] Як зазначено в Таблиці 12, у першому форматі тесту, 23 з 27 антитіл проти PD-1 блокували 1,5 нМ hPD-1-mFc від зв'язування з hPD-L1-hFc зі значеннями IC<sub>50</sub> в інтервалі від 190 пМ до 3,3 нМ, із відсотковим максимальним блокуванням в інтервалі від 67 до 100 %. Одне антитіло, H2aM7796N, було ідентифіковане як неблокатор. Три антитіла проти PD-1

10 (H4H9068P2, H1M7789N і H2aM7791N) ідентифікували як неблокатори/енхансери.

[0208] Як показано в Таблиці 13, у другому форматі тесту, 23 з 27 антитіл проти PD-1 блокували 200 пМ біот-hPD-1-hFc від зв'язування з hPD-L1-mFc зі значеннями IC<sub>50</sub> в інтервалі від 59 пМ до 1,3 нМ, із відсотковим максимальним блокуванням в інтервалі від 60 % до 101 %. Одне антитіло, H1M7789N, було ідентифіковане як неблокатор. Три антитіла проти PD-1

15 (H4H9057P2, H4H9068P2 і H2aM7791N) ідентифікували як неблокатори/енхансери.  
[0209] У третьому форматі тесту, як показано в Таблиці 14, тестували чотири антитіла проти PD-1 винаходу і ізотипічний контроль. Усі 4 антитіла проти PD-1 винаходу блокували 100 пМ (фіксована концентрація) hPD-1-mFc від зв'язування з покриттям hPD-L2-hFc на планшеті зі значеннями IC<sub>50</sub> в інтервалі від 0,13 нМ до 1,3 нМ і з відсотковим максимальним блокуванням в

20 інтервалі від 94 до 100 %.  
Приклад 5. Блокування зв'язування PD-1 з PD-L1, визначене за допомогою біосенсорного тесту і поверхневого плазмонного резонансу

[0210] Інгібування PD-1 людини від зв'язування з людським PD-L1 за допомогою різних моноклональних антитіл проти PD-1 досліджували, або використовуючи тест із інтерферометрією біошару в режимі реального часу на біосенсорному приладі Octet Red96 (Fortebio Inc.), або застосовуючи тест із поверхневим плазмонним резонансом біосенсора в режимі реального часу на приладі Biacore 3000.

[0211] Дослідження інгібування моноклональних антитіл проти PD-1, експресованих з мишачим Fc, проводили на приладі Octet Red96. Спочатку, 100 нМ рекомбінантного PD-1 людини, експресованого з С-кінцевою Fc-міткою мишачого IgG2a (hPD-1-mFc; SEQ ID NO: 323), інкубували з 500 нМ кожного моноклонального антитіла проти PD-1 протягом щонайменше 1 години перед початком тесту на інгібування. Приблизно 0,8-1,2 нМ рекомбінантного людського PD-L1, експресованого з С-кінцевою Fc-міткою людського IgG1 (hPD-L1-hFc; SEQ ID NO: 325), піддавалися захопленню з використанням захоплення Fc проти людського IgG біосенсором Octet. Біосенсиори Octet, покриті hPD-L1-hFc, потім занурювали в ямки, що містять суміш hPD-1-mFc і різних моноклональних антитіл проти PD-1. Весь експеримент проводили при 25 °C у буфері Octet HBST (0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05 % об./об. поверхнево-активної речовини P20, 0,1 мг/мл BSA) при струшуванні планшета зі швидкістю 1000 об./хв. Біосенсиори промивали в буфері Octet HBST між кожною стадією експерименту. Відповіді зв'язування в режимі реального часу реєстрували протягом усього проходження експерименту і відповідь зв'язування наприкінці кожної стадії записували. Зв'язування hPD-1-mFc із захопленням hPD-L1-hFc порівнювали в присутності і за відсутності різних моноклональних антитіл проти PD-1 і використовували для визначення блокуючої поведінки тестованих антитіл, як показано в Таблиці 15.



Таблиця 15

Інгібування зв'язування людського PD-L1 з PD-1 моноклональними антитілами проти PD-1, експресованими з мишачим Fc, виміряне на приладі Octet Red96

Антитіло проти PD-1	Кількість захопленого hPD-L1-hFc (нМ)	Зв'язування суміші 100 нМ hPD-1-mFc і 500 нМ моноклонального антитіла проти PD-1 (нМ)	% блокування
Без антитіла	0,77	0,07	0
H2aM7780N	1,07	-0,01	114
H2aM7788N	0,74	0,00	100
H1M7789N	0,80	0,05	29
H2aM7790N	0,90	-0,01	114
H2aM7791N	1,17	0,23	-229
H2aM7794N	0,87	-0,01	114
H2aM7795N	0,28	-0,01	114
H2aM7796N	0,82	-0,02	129
H2aM7798N	0,85	0,01	86
H1M7799N	0,79	0,00	100
H1M7800N	0,96	0,00	100

[0212] Як показано в Таблиці 15, 9 з 11 антитіл проти PD-1, тестованих на приладі Octet Red96, демонстрували сильне блокування hPD-1-mFc від зв'язування з hPD-L1-hFc в інтервалі від 86 % до повного блокування зв'язування. Одне тестоване антитіло проти PD-1 (H1M7789N) показало більш слабке блокування зв'язування hPD-1-mFc з hPD-L1-hFc з 29 % блокуванням. Одне тестоване антитіло (H2aM7791N) демонструвало здатність підсилювати зв'язування hPD-1-mFc з hPD-L1-hFc.

[0213] Далі, дослідження інгібування для моноклональних антитіл проти PD-1, експресованих з людським Fc, проводили на приладі Biacore 3000. Спочатку, 100 нМ рекомбінантного PD-1 людини, експресованого з С-кінцевою Fc-міткою людського IgG1 (hPD-1-hFc; SEQ ID: 324), інкубували з 500 нМ кожного моноклонального антитіла проти PD-1 протягом щонайменше 2 годин до проходження тесту на інгібування. Поверхню сенсора CM5 Biacore спочатку дериватизували поліклональними кролячими антитілами проти мишачих антитіл (GE Catalog #BR-1008-38), використовуючи стандартну хімію EDC-NHS. Приблизно 730 RU рекомбінантного людського PD-L1, експресованого з С-кінцевою Fc-міткою мишачого IgG2a (hPD-L1-mFc; SEQ ID: 326), потім піддавали захопленню з наступною ін'єкцією 100 нМ hPD-1-hFc у присутності і за відсутності різних моноклональних антитіл проти PD-1 при швидкості потоку, що дорівнює 25 мкл/хв., протягом 3 хвилин. Весь експеримент проводили при 25 °C у рухомому буфері, що містить 0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05 % об./об. поверхнево-активної речовини Tween-20 (рухомий буфер HBS-ET). Відповіді зв'язування в режимі реального часу реєстрували протягом всього експерименту і відповідь зв'язування наприкінці кожної стадії записували. Зв'язування hPD-1-hFc із захопленим hPD-L1-mFc порівнювали в присутності і за відсутності різних моноклональних антитіл проти PD-1 і застосовували для визначення блокуючої поведінки тестованих антитіл, як показано в Таблиці 16.

Таблиця 16

Інгібування зв'язування людського PD-L1 з PD-1 моноклональними антитілами проти PD-1, експресованими з людським Fc, виміряне на приладі Biacore 3000

Моноклональне антитіло проти PD-1	500 нМ моноклонального антитіла проти PD-1 (RU)	Зв'язування суміші 100 нМ hPD-1-hFc і 500 нМ моноклонального антитіла проти PD-1 (RU)	% блокування
Без антитіла	N/A	100±1,78	N/A
H4H9019P	-2	-1	101
H4xH9034P	-4	-5	105
H4xH9035P	-3	-4	104
H4xH9037P	-4	-4	104
H4xH9045P	-4	-5	105
H4H9048P2	-7	9	91
H4H9057P2	58	57	43
H4H9068P2	-2	365	-265
H4xH9119P2	-5	-5	105
H4xH9120P2	1	0	100
H4xH9128P2	-5	-5	105
H4xH9135P2	-3	-3	102
H4xH9145P2	-8	-6	106
H4xH8992P	3	2	98
H4xH8999P	1	0	100
H4xH9008P	0	1	99
H4H7795N2	-5	-6	106
H4H7798N	-6	-6	106
H4H9008P	-7	-7	107
H4H9048P2	-4	6	94

[0214] Як показано в Таблиці 16, 18 з 20 антитіл винаходу проти PD-1, тестованих на приладі Biacore 3000, показали сильне блокування hPD-1-hFc від зв'язування з hPD-L1-mFc з показником блокування в інтервалі від 96 до 100 %. Одне антитіло демонструвало здатність підсилювати зв'язування hPD-1-hFc з hPD-L1-mFc. У цьому дослідженні, одне з тестованих антитіл винаходу (H4H9057P2) демонструвало неспецифічне фонове зв'язування з поверхню захоплення проти мишачого Fc.

Приклад 6. Перехресне конкурування між антитілами проти PD-1 на Octet

[0215] Конкуренцію за зв'язування між моноклональними антитілами проти PD-1 визначали, використовуючи тест із інтерферометрією у режимі реального часу біошару без мітки на біосенсорі Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.). Весь експеримент проводили при 25 °C у 0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05 % об./об. поверхнево-активної речовини Tween-20, 0,1 мг/мл BSA (Octet HBS-ET-буфер), при струшуванні планшета зі швидкістю 1000 об./хв. Щоб оцінити, чи здатні 2 антитіла конкурувати одне з одним за зв'язування з їх відповідними епітопами на рекомбінантно експресованому PD-1 людини з С-кінцевою тус-тус-гексагістидиновою міткою (hPD-1-MMH; SEQ ID: 321), спочатку проводили захоплення приблизно 0,1 нМ hPD-1-MMH поверхню наконечників біосенсора Octet, покритих антитілом проти пента-His (Pall ForteBio Corp., #18-5079), за допомогою занурення наконечників протягом 5 хвилин у ямки, що містять розчин 50 мкг/мл hPD-1-MMH. Наконечники біосенсора з захопленим антигеном потім насичували першим моноклональним антитілом проти PD-1 (надалі іменованим mAb-1) за допомогою занурення в ямки, що містять розчин 50 мкг/мл mAb-1, протягом 5 хвилин. Наконечники біосенсора потім послідовно занурювали в ямки, що містять розчин 50 мкг/мл другого моноклонального антитіла проти PD-1 (надалі іменованого mAb-2). Наконечники біосенсора промивали в буфері Octet HBS-ET між кожною стадією експерименту. Відповідь зв'язування в режимі реального часу реєстрували в ході експерименту і відповідь зв'язування наприкінці кожної стадії записували. Відповідь зв'язування mAb-2 з hPD-1-MMH, що попередньо утворило комплекс з mAb-1, порівнювали і визначали конкурентну/неконкурентну поведінку різних моноклональних антитіл проти PD-1. Результати узагальнені в Таблиці 17 (\*Самоконкуруючі mAb-2 не наведені).

Перехресна конкуренція між парами вибраних антитіл проти PD-1

Перше застосовуване антитіло ("mAb-1")	Антитіла mAb2 з показаною конкуренцією з mAb-1*
H4xH8992P	H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N
H4xH8999P	H4xH8992P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H4xH9008P
H1M7799N	H4xH8992P, H4xH8999P, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N
H2aM7780N	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H4xH9008P
H1M7800N	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H4xH9008P
H2aM7788N	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N
H2aM7794N	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H4xH9008P
H2aM7798N	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H4xH9008P
H4xH9145P2	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H4xH9008P
H4H9057P2	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N, H4xH9048P2
H4xH9120P2	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H4xH9048P2

H4xH9128P2	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H4xH9008P, H4H9066P2, H4xH9048P2
H4H9019P	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H2aM7788N, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N
H4xH9119P2	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H2aM7788N, H4H9019P, H4xH9135P2, H4xH9034P, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N
H4xH9135P2	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H2aM7788N, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9034P, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N
H4xH9034P	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H2aM7788N, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N
H2aM7790N	H4xH8992P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4xH9034P, H4xH8999P, H4xH9008P
H4xH9035P	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H2aM7788N, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9034P, H4xH9135P2, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N
H4xH9037P	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H2aM7788N, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9034P, H4xH9135P2, H4xH9035P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N
H4xH9045P	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H2aM7788N, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9034P, H4xH9135P2, H4xH9035P, H4xH9037P, H2aM7795N, H2aM7791N
H2aM7795N	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4H9057P2, H2aM7788N, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9034P, H4xH9135P2, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7791N
H4xH9008P	H4xH8999P, H2aM7780N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4xH9128P2, H2aM7790N, H4H9068P2, H1M7799N, H4xH9048P2
H2aM7791N	H2aM7788N, H4H9057P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N
H4H9068P2	H4xH9128P2, H4xH9008P, H1M7789N, H4xH9048P2
H1M7789N	H4xH9008P, H4H9068P2, H4xH9048P2
H4xH9048P2	H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9008P, H4H9068P2, H1M7799N

- 5 [0216] Другу конкуренцію за зв'язування між панеллю вибраних моноклональних антитіл проти PD-1 визначали, використовуючи тест із інтерферометрією у режимі реального часу, біошару без мітки на біосенсорі Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.). Весь експеримент проводили при 25 °C у 0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05 % об./об. поверхнево-активної речовини Tween-20, 0,1 мг/мл BSA (Octet HBS-ET-буфер), при струшуванні планшета зі швидкістю 1000 об./хв. Щоб оцінити, чи здатні 2 антитіла конкурувати одне з одним за зв'язування з їх відповідними епітопами на hPD-1-MMH, спочатку проводили захоплення

приблизно 0,25 нМ hPD-1-ММН на поверхні наконечників біосенсора Octet, покритих антитілом проти пента-His (Fortebio Inc., #18-5079), за допомогою занурення наконечників на 150 секунд у ямки, що містять розчин 10 мкг/мл hPD-1-ММН. Наконечники біосенсора з захопленням антигену потім насичували першим моноклональним антитілом проти PD-1 (надалі названим mAb-1) за допомогою занурення в ямки, що містять розчин 100 мкг/мл mAb-1, на 5 хвилин. Наконечники біосенсора потім послідовно занурювали в ямки, що містять розчин 100 мкг/мл другого моноклонального антитіла проти PD-1 (надалі названого mAb-2), на 4 хвилини. Усі біосенсиори промивали в буфері Octet HBS-ET між кожною стадією експерименту. Відповідь зв'язування в режимі реального часу реєстрували в ході експерименту і відповідь зв'язування наприкінці кожної стадії записували, як показано на Фіг. 2. Відповідь зв'язування mAb-2 з hPD-1-ММН, що попередньо утворило комплекс із mAb-1, порівнювали і визначали конкурентну/неконкурентну поведінку різних моноклональних антитіл проти PD-1. Результати узагальнені в Таблиці 18 (\*Самоконкуруючі mAb-2 не наведені).

Таблиця 18

Перехресна конкуренція між парами вибраних антитіл проти PD-1

Перше застосовуване антитіло ("mAb-1")	Антитіла mAb-2 з показаною конкуренцією з mAb-1*
H4H7795N2	H4H7798N
H4H7798N	H4H7795N2; H4H9008P
H4H9008P	H4H7798N; H4H9068P2
H4H9068P2	H4H9008P; H4H9048P2
H4H9048P2	H4H9068P2

15

[0217] При експериментальних умовах, розкритих у даному Прикладі, H4H7795N2 перехресно конкурувало з H4H7798N; H4H7798N перехресно конкурувало з H4H7795N2 і H4H9008P; H4H9008P перехресно конкурувало з H4H7798N і H4H9068P2; H4H9068P2 перехресно конкурувало з H4H9008P і H4H9048P2.

20

Приклад 7. Зв'язування антитіла з клітинами, надекспресуючими PD-1

[0218] Зв'язування антитіла проти PD-1 з людською лінією ембріональних клітин нирки (HEK293; ATCC, #CRL-1573), стабільно трансфікованих непроцесованим PD-1 людини (амінокислоти 1-289 з обліковим номером NP\_005009.2) (HEK293/hPD-1), визначали за допомогою FACS.

25

[0219] Для тесту адгезивні клітини від'єднували з використанням трипсину або безферментного дисоціаційного буфера і блокували повним середовищем. Клітини центрифугували і ресуспендували при концентрації, що дорівнює  $2,5-6 \times 10^6$  клітин/мл, у холодному PBS, що містить 2 % FBS. Батьківські клітини HEK293 і клітини HEK293/hPD-1 потім інкубували протягом 15-30 хв. на льоду з використанням 100 нМ кожного антитіла проти PD-1.

30

Незв'язані антитіла видаляли промиванням D-PBS, що містить 2 % FBS, і клітини послідовно інкубували з алофікоціанін-кон'югованим вторинним F(ab')<sub>2</sub>, що розпізнає або людський Fc (Jackson ImmunoResearch, #109-136-170), або мишачий Fc (Jackson ImmunoResearch, #115-136-146), протягом 15-30 хвилин на льоду. Клітини промивали D-PBS, що містить 2 % FBS, для видалення незв'язаного вторинного F(ab')<sub>2</sub> і вимірювання флуоресценції проводили, використовуючи або проточний цитометр HyperCyt (IntelliCyt, Inc.), або проточний цитометр Accuri (BD Biosciences). Дані аналізували, використовуючи програмне забезпечення FlowJo (Tree Star).

35

Зв'язування антитіл проти PD-1 з клітинами HEK293/hPD-1 і батьківськими клітинами HEK293 за даними FACS

Антитіло	FACS на батьківських клітинах HEK293 [MFI]	FACS на клітинах HEK293/hPD-1 [MFI]	Відношення клітин HEK293/hPD-1 до батьківських клітин HEK293
H1M7789N	262	24166	92,3
H1M7799N	255	6855	26,9
H1M7800N	275	6812	24,7
H2aM7780N	320	23656	73,8
H2aM7788N	305	23112	75,7
H2aM7790N	270	47310	175,5
H2aM7791N	274	4948	18,0
H2aM7794N	270	19127	71,0
H2aM7795N	288	817	2,8
H2aM7796N	297	49755	167,8
H2aM7798N	300	23443	78,1
H4H9019P	111	8610	77,2
H4H9057P2	141	6501	46,1
H4H9068P2	285	1940	6,8
H4xH8992P	358	17502	48,9
H4xH8999P	809	28875	35,7
H4xH9008P	509	26233	51,5
H4xH9034P	147	10115	69,0
H4xH9035P	108	9915	91,7
H4xH9037P	108	8787	81,4
H4xH9045P	95	8884	93,7
H4xH9048P2	102	7196	70,8
H4xH9119P2	109	9142	84,0
H4xH9120P2	109	9975	91,9
H4xH9128P2	135	9081	67,5
H4xH9135P2	114	9380	82,2
H4xH9145P2	226	11552	51,2

[0220] Як показано в Таблиці 19, 25 з 27 антитіл проти PD-1 винаходу показували сильне зв'язування з клітинами HEK293/hPD-1 у порівнянні зі зв'язуванням на батьківській лінії HEK293. Два антитіла винаходу (H2aM7795N і H4H9068P2) зв'язувалися слабкіше з клітинами, експресуючими PD-1 людини, в порівнянні з іншими тестованими антитілами.

[0221] Щоб додатково характеризувати антитіла винаходу проти PD-1, дозозалежне зв'язування з людською лінією ембріональних клітин нирки (HEK293; ATCC, #CRL-1573), стабільно трансфікованих непрцесованим PD-1 людини (амінокислоти 1-289 з обліковим номером NP\_005009.2) (HEK293/hPD-1), визначали за допомогою FACS.

[0222] Для тесту адгезивні клітини від'єднували з використанням трипсину і блокували повним середовищем. Клітини центрифугували і ресуспендували при концентрації, що дорівнює  $6 \times 10^6$  клітин/мл, у забарвлюючому буфері (1 % FBS у PBS). Для визначення  $EC_{50}$  і  $E_{max}$  антитіл проти PD-1, 90 мкл суспензії клітин інкубували протягом 30 хвилин на льоду із серійним розведенням антитіл проти PD-1 і контролів, розведених до кінцевої концентрації в інтервалі від 5 пМ до 100 нМ (жодного зразка mAb не було включено як негативний контроль) у забарвлюючому буфері. Клітини потім центрифугували і згустки однократно промивали забарвлюючим буфером для видалення незв'язаних антитіл. Клітини послідовно інкубували протягом 30 хвилин на льоду з алофікоціанін-кон'югованим вторинним F(ab')<sub>2</sub>, що розпізнає людський Fc (Jackson ImmunoResearch, #109-136-170) або мишачий Fc (Jackson ImmunoResearch, #115-136-071). Клітини центрифугували і згустки однократно промивали забарвлюючим буфером для видалення незв'язаного вторинного F(ab')<sub>2</sub>, і потім фіксували

- протягом ночі з використанням 1:1 розведення Cytofix (BD Biosciences, #554655) і забарвлюючого буфера. Наступного дня, клітини центрифугували і згустки однократно промивали забарвлюючим буфером, ресуспендували й відфільтровували. Вимірювання флуоресценції проводили на цитометрі Hypercyt® і аналізували в ForeCyt™ (IntelliCyt; Albuquerque, NM) для визначення середніх інтенсивностей флуоресценції (MFI). Значення EC<sub>50</sub> розраховували по чотиріпараметричному логістичному рівнянню для 11-точкової кривої відповіді, використовуючи GraphPad Prism. E<sub>max</sub> для кожного антитіла визначали як зв'язування при найвищій дозі тестованого антитіла (100 нМ).

Таблиця 20

## Дозозалежне FACS-зв'язування антитіл проти PD-1 із клітинами HEK293/hPD-1

Антитіло	EC <sub>50</sub> [M]	Макс. геометр. середнє [MFI] @ 100 нМ
H2aM7779N	2,59E-09	16832
H2aM7780N	1,69E-09	18415
H2aM7781N	5,67E-10	13740
H2aM7782N	1,26E-09	17302
H2aM7787N	2,40E-09	15744
H2aM7788N	3,21E-10	14827
H2aM7790N	1,71E-10	19196
H2aM7791N	EC <sub>50</sub> не визначено	1397
H2aM7794N	1,37E-09	16406
H2aM7795N	EC <sub>50</sub> не визначено	624
H2aM7798N	6,985E-11	20900
H1M7799N	3,318E-11	24405
H1M7800N	4,80E-11	20763
H4xH8992P	5,45E-11	11368
H4xH8999P	5,27E-11	28341
H4H9019P	1,40E-09	29201
H4xH9034P	2,09E-10	32388
H4xH9035P	1,15E-10	28708
H4xH9037P	6,74E-10	36441
H4xH9045P	9,17E-11	24662
H4xH9048P2	6,68E-10	33687
H4H9057P2	2,363E-10	19953
H4H9068P2	EC <sub>50</sub> не визначено	639
H4xH9119P2	3,476E-10	37789
H4xH9120P2	4,797E-10	34057
H4xH9128P2	1,551E-09	37167
H4xH9135P2	1,048E-10	32793
H4xH9145P2	2,321E-10	30613
mIgG1 ізотип	N/A	200
mIgG2a ізотип	N/A	239
hIgG4 ізотип	N/A	459

Таблиця 21

Дозозалежне FACS-зв'язування антитіл проти PD-1 з клітинами HEK293/hPD-1

Антитіло	EC <sub>50</sub> [M]	Макс. геометр. середнє [MFI] @ 100 нМ
H4H7795N2	Неостаточна	15188
H4H7798N	5,09E-10	20305
H4H9008P	Неостаточна	32230
H4H9048P2	1,60E-09	39774
H1M7789N	Неостаточна	35574
H2aM7796N	4,81E-09	14111
mIgG1 ізотип	N/A	858
mIgG2a ізотип	N/A	352
hIgG4 ізотип	N/A	809

[0223] Як показано в Таблиці 20, 25 з 28 антитіл проти PD-1 винаходу показали дозозалежне зв'язування з клітинами HEK293/hPD-1 зі значеннями EC<sub>50</sub> в інтервалі від 33,18 нМ до 2,59 нМ і значеннями E<sub>max</sub> в інтервалі від 37,789 до 11,368 MFI. Три антитіла винаходу проти PD-1 не демонстрували сильного зв'язування з клітинами HEK293/hPD-1, і, отже, значення не могло бути визначене. Жоден з ізотипічних контролів не демонстрував якого-небудь вимірюваного зв'язування в даному тесті.

[0224] Як показано в Таблиці 21, 3 з 6 антитіл проти PD-1 винаходу показали дозозалежне зв'язування з клітинами HEK293/hPD-1 зі значеннями EC<sub>50</sub> в інтервалі від 509 нМ до 4,81 нМ і значеннями E<sub>max</sub> в інтервалі від 39,774 до 14,111 MFI. Три тестованих антитіла винаходу зв'язувалися з клітинами HEK293/hPD-1, але не досягали плато. Отже, їх точні значення EC<sub>50</sub> не могли бути визначені і їх значення EC<sub>50</sub> вважаються неостаточними. Жоден з ізотипічних контролів не демонстрував якого-небудь вимірюваного зв'язування в даному тесті.

Приклад 8. Блокування PD-1-індукованої понижувальної регуляції Т-клітин у тесті з Т-клітинним/APC люциферазним репортером

[0225] Активация Т-клітин досягається за допомогою стимуляції Т-клітинних рецепторів (TcR), що розпізнають конкретні пептиди, представлені основними білками комплексу гістосумісності класу I або II на антигенпрезентуючих клітинах (APC). Активовані ТсR у свою чергу ініціюють каскад подій передачі сигналів, які можуть реєструватися репортерними генами, керованими факторами транскрипції, такими як активаторний білок 1 (AP-1), ядерний фактор активованих Т-клітин (NFAT) або енхансер ядерного фактора каппа-легкого ланцюга активованих В-клітин (NFkB). Т-клітинна відповідь модулюється через мобілізацію корецепторів, експресованих або конститутивно, або індуковано на Т-клітинах. Одним таким рецептором є PD-1, негативний регулятор Т-клітинної активності. PD-1 взаємодіє зі своїм лігандом, PD-L1, що експресується на цільових клітинах, які включають APC або пухлинні клітини, і діє для доставки інгібіторних сигналів за допомогою рекрутингу фосфатаз до ТсR-сигналосоми, що приводить у результаті до пригнічення позитивної передачі сигналів.

[0226] Здатність антитіл проти PD-1 антагонізувати PD-1/PD-L1-опосередковану передачу сигналів через рецептор PD-1 у людських Т-клітинних лініях оцінювали, використовуючи аналітичний тест in vitro на клітинній основі, показаний на Фіг. 1. Біотест був розроблений для вимірювання передачі сигналів Т-клітинами, індукованої взаємодією між APC і Т-клітинами з використанням змішаної культури, одержаної з двох клітинних ліній ссавців: клітин Юркат (лінія іморталізованих Т-клітин) і клітин Раджі (лінія В-клітин). Для першого компонента біотесту, клітини Юркат клону Е6-1 (ATCC, #TIB-152) трансдукували з використанням репортера Signal Lenti AP-1 Luc (Qiagen-Sabiosciences, #CLS-011L), відповідно до інструкцій виробника. Лентівірус кодує ген люциферази світлячка під керуванням мінімального CMV-промотору, тандемні повтори елемента TPA-індукованої транскрипційної відповіді (TRE) і ген резистентності до пуроміцину. Сконструйовану клітинну лінію Юркат послідовно трансдукували химерою PD-1, що містить позаклітинний домен PD-1 людини (амінокислоти від 1 до 170 людського PD-1; обліковий номер NP\_005009.2) і трансмембранний і цитоплазматичний домен людського CD300a (амінокислоти від 181 до 299 людського CD300a; обліковий номер NP\_009192.2). Одержану в результаті стабільну клітинну лінію (Юркат/AP1-Luc/hPD-1-hCD300a) відбирали і підтримували в RPMI/10 % FBS/пеніцилін/стрептоміцин/глутамін, доповненому 500 мкг/мл G418+1 мкг/мл пуроміцину.



[0227] Для другого компонента біотесту, клітини Раджі (ATCC, #CCL-86) трансдукували з використанням людського гена PD-L1 (амінокислоти 1-290; обліковий номер NP\_054862.1), які клонували в лентивірусну (pLEX) векторну систему (Thermo Scientific Biosystems, #OHS4735). Клітини Раджі, позитивні до PD-L1 (Раджі/hPD-L1), ізолювали за допомогою FACS, використовуючи антитіло до PD-L1, і підтримували в Iscove/10 % FBS/пеніцилін/стрептоміцин/глутамін, доповненому 1 мкг/мл пуроміцину.

[0228] Для стимуляції взаємодії APC/Т-клітини, використовували біспецифічне антитіло, яке складається з одного плеча Fab, що зв'язується з CD3 на Т-клітинах, і одного іншого плеча зв'язування Fab, що зв'язується з CD20 на клітинах Раджі (біспецифічне антитіло CD3хCD20; наприклад, як розкрито в US 20140088295). Присутність біспецифічної молекули в аналітичному тесті приводить до активації Т-клітин і APC за допомогою утворення містків між субодиницями CD3 на Т-клітинах з CD20, ендогенно експресованими в клітинах Раджі. Було продемонстровано, що лігування CD3 з антитілами проти CD3 веде до активації Т-клітин. У даному біотесті, антитіла, що блокують взаємодію PD-1/PD-L1, рятують активність Т-клітин за допомогою виведення з ладу інгібіторного сигнального шляху, що надалі приводить до збільшеної активації AP1-Luc.

[0229] У люциферазному біотесті, RPMI1640, доповнене 10 % FBS і пеніцилін/стрептоміцин/глутаміном, застосовували як аналітичне середовище для одержання клітинних суспензій і розведень антитіла для проведення скринінгу моноклональних антитіл (mAbs) проти PD-1. У день скринінгу, визначали значення  $EC_{50}$  mAbs проти PD-1, у присутності фіксованої концентрації біспецифічного антитіла CD3хCD20 (30 пМ), а також  $EC_{50}$  для окремого біспецифічного антитіла. У наступному порядку клітини і реагенти додавали в 96-ямкові білі плоскодонні планшети. Для визначень  $EC_{50}$  mAb проти PD-1, одержували першу фіксовану концентрацію біспецифічного антитіла CD3хCD20 (остаточна 30 пМ) і додавали в ямки планшета для мікротитрування. Потім додавали 12-точкові серійні розведення mAb проти PD-1 і контролю (кінцеві концентрації в інтервалі від 1,7 пМ до 100 нМ; плюс ямки з середовищем для аналізу окремо). Для визначення  $EC_{50}$  біспецифічного антитіла (окремо узятим), біспецифічне антитіло, при кінцевих концентраціях в інтервалі від 0,17 пМ до 10 нМ (плюс ямки з середовищем для аналізу окремо), додавали в ямки планшета для мікротитрування. Послідовно одержували суспензію з  $2,5 \times 10^6$ /мл клітин Раджі/hPD-L1, і додавали 20 мкл на ямку (при кінцевому числі  $5 \times 10^4$  клітин/ямку). Планшети залишали при кімнатній температурі (15-20 хвилин), у той час як одержували суспензію з  $2,5 \times 10^6$ /мл Юркат/AP1-Luc/hPD-1(ecto)-hCD300a(ТМ-цито). 20 мкл суспензії клітин Юркат (при кінцевому числі  $5 \times 10^4$  клітин/ямку) додавали в ямки. Планшети, що містять суміщену культуру, інкубували протягом 5-6 годин при 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>. Зразки тестували в двох повторностях, і люциферазну активність потім виявляли після додавання реагенту ONE-Glo™ (Promega, #E6051), а відносні світлові одиниці (RLU) вимірювали на люмінометрі Віктора.

[0230] Значення RLU для кожного скринюваного антитіла нормалізували за допомогою установлення умови аналізу з фіксованою (30 пМ) концентрацією біспецифічного антитіла CD3/CD20, але без антитіла проти PD-1, до 100 %. Ця умова відповідає максимальній відповіді AP1-Luc, що викликається біспецифічною молекулою в присутності інгібіторного сигналу PD-1/PD-L1. При додаванні антитіла проти PD-1, інгібіторний сигнал пригнічується, і збільшена стимуляція показана тут як  $E_{max}$ , відсоткове збільшення сигналу в присутності найвищої тестованої дози антитіла (100 нМ). Для порівняння активності тестованого антитіла проти PD-1, концентрацію антитіла, при якій нормалізоване значення RLU досягало 150 % активації, визначали по чотирипараметричному логістичному рівнянню для 12-точкової кривої відповіді, використовуючи GraphPad Prism. Результати узагальнені в Таблиці 22 і Таблиці 23, відповідно.

Блокування антитілом проти PD-1 PD-1/PD-L1-залежного  
інгібування сигнального шляху AP1-Luc в Експерименті 1

Антитіло	Антагоністичний аналіз Концентрація (М) антитіла при 150 % активації Експеримент 1	Антагоністичний аналіз E <sub>max</sub> середн. [%] @ 100 нМ Експеримент 1
H1M7789N	N/A	135
H1M7799N	2,97E-08	183
H1M7800N	1,65E-08	182
H2aM7779N	8,92E-09	214
H2aM7780N	6,52E-09	228
H2aM7781N	6,70E-09	230
H2aM7782N	9,96E-09	215
H2aM7787N	1,38E-08	215
H2aM7788N	4,72E-09	189
H2aM7790N	5,24E-09	234
H2aM7791N	N/A	103
H2aM7794N	4,09E-08	170
H2aM7795N	N/A	109
H2aM7796N	N/A	121
H2aM7798N	7,99E-10	239
H4H9019P	1,79E-08	180
H4xH9034P	2,62E-09	202
H4xH9035P	1,20E-09	227
H4xH9037P	2,82E-09	195
H4xH9045P	2,23E-08	176
H4xH9048P2	N/A	138
H4H9057P2	2,68E-08	212
H4H9068P2	N/A	102
H4xH9119P2	1,11E-08	163
H4xH9120P2	1,10E-08	166
H4xH9128P2	3,99E-09	187
H4xH9135P2	1,55E-09	193
H4xH9145P2	2,40E-09	185
H4xH8992P	5,32E-09	178
H4xH8999P	8,63E-10	217
H4H7798N	1,54E-09	202
mIgG1 ізотипічний контроль	N/A	92
mIgG2a ізотипічний контроль	N/A	91
hIgG4 ізотипічний контроль	N/A	94

N/A=незастосовно, оскільки при тестованих концентраціях ці антитіла не активують 150 %.

Таблиця 23

Блокування антитілом проти PD-1 PD-1/PD-L1-залежного  
інгібування сигнального шляху AP1-Luc в Експерименті 2

Антитіло	Антагоністичний аналіз Концентрація (М) антитіла при 150 % активації Експеримент 2	Антагоністичний аналіз E <sub>max</sub> середн. [%] @ 100 нМ Експеримент 2
H4H7795N2	N/A	110
H4H7798N	1,59E-10	343
H4H9008P	9,84E-08	150
H4H9048P	N/A	134
hIgG4 ізотипічний контроль	N/A	98

N/A=незастосовно, оскільки при тестованих концентраціях ці антитіла не активують 150 %.

[0231] Як показано в Таблиці 22, 25 з 31 протестованого антитіла винаходу проти PD-1 блокували інгібування PD-1/PD-L1 зі значеннями E<sub>max</sub> в інтервалі від 239 до 163 %. Шість з 31 антитіла винаходу проти PD-1 не демонстрували суттєвої блокади взаємодії PD-1/PD-L1 при тестуванні в даному аналізі.

[0232] Як показано в Таблиці 23, 2 з 4 протестованих антитіл винаходу проти PD-1 блокували інгібування PD-1/PD-L1 зі значеннями E<sub>max</sub>, що дорівнюють 150 і 343 %, відповідно. 2 з 4 антитіл винаходу проти PD-1 не демонстрували суттєвої блокади взаємодії PD-1/PD-L1 при тестуванні в даному аналізі.

Приклад 9. Ефективність дії антитіл проти PD-1 in vivo

[0233] Щоб визначити ефект вибраного числа антитіл винаходу проти PD-1 на релевантній моделі in vivo, три дослідження росту пухлини MC38.ova, що включають підшкірну ін'єкцію пухлинних клітин і починаються в різні Дні, проводили на мишах, які були гомозиготними для експресії позаклітинного домену PD-1 людини замість позаклітинного домену мишачого PD-1 (PD-1 мишей HumIn) на основі 75 % штаму 129 C57/Bl6/25 %.

[0234] Для досліджень, мишей рівномірно розділяли відповідно до маси тіла на 5 груп лікування або контрольних груп для Дослідження 1 (5 мишей на групу), 8 груп лікування або контрольних груп для Дослідження 2 (5 мишей на групу) і 5 груп лікування або контрольних груп для Дослідження 3 (7 мишей на групу). У День 0, мишей піддавали анестезії за допомогою інгаляції ізофлураном і потім вводили за допомогою підшкірної ін'єкції в правий бік клітини 5×10<sup>5</sup> MC38.ova у суспензії 100 мкл DMEM для Дослідження 1 або клітини 1×10<sup>6</sup> MC38.ova у суспензії 100 мкл DMEM для Дослідження 2 і Дослідження 3. Для Дослідження 1, групам лікування вводили за допомогою внутрішньоочеревинної ін'єкції 200 мкг або одне з трьох антитіл винаходу проти PD-1, або ізотипічне контрольне антитіло з нерелевантною специфічністю в Дні 3, 7, 10, 14 і 17 експерименту, у той час як одна група мишей не піддавався лікуванню. Для Дослідження 2 групам лікування вводили за допомогою внутрішньоочеревинної ін'єкції або одне з трьох антитіл винаходу проти PD-1 при 10 мг/кг або 5 мг/кг на дозу, одне антитіло винаходу (H4H7795N2) при 10 мг/кг на дозу, або ізотипічне контрольне антитіло з нерелевантною специфічністю при 10 мг/кг у Дні 3, 7, 10, 14 і 17 експерименту. Для Дослідження 3, групам лікування вводили за допомогою внутрішньоочеревинної ін'єкції або одне з двох антитіл винаходу проти PD-1 при 5 мг/кг або 2,5 мг/кг на дозу, або ізотипічне контрольне антитіло з нерелевантною специфічністю при 5 мг/кг у Дні 3, 7, 10, 14 і 17 експерименту. Експериментальне дозування і протокол лікування для груп мишей показані в Таблиці 24.

Таблиця 24

Експериментальне дозування і протокол лікування для груп мишей

Дослідження #	Тестовані зразки	Дозована кількість в кожній часовій точці дозування	Інтервал дозування
1	Ізотипічний контроль	200 мкг	Дні 3, 7, 10, 14, 17
	Без лікування	N/A	N/A
	H4H7798N	200 мкг	Дні 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7795N2	200мкг	Дні 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	200 мкг	Дні 3, 7, 10, 14, 17
2	Ізотипічний контроль	10 мг/кг	Дні 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7795N2	10 мг/кг	Дні 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7798N	10 мг/кг	Дні 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7798N	5 мг/кг	Дні 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9048P2	10 мг/кг	Дні 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9048P2	5 мг/кг	Дні 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	10 мг/кг	Дні 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	5 мг/кг	Дні 3, 7, 10, 14, 17
3	Ізотипічний контроль	5 мг/кг	Дні 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7798N	5 мг/кг	Дні 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7798N	2,5 мг/кг	Дні 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	5 мг/кг	Дні 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	2,5мг/кг	Дні 3, 7, 10, 14, 17

[0235] Для досліджень, реєстрували середній об'єм пухлин, визначений за допомогою вимірювань циркулем, і відсоток виживаності в День 14 або 17 і День 23 або 24 кожного експерименту для кожної групи лікування. На доповнення, також оцінювали число безпухлинних мишей наприкінці дослідження (День 42 для Дослідження 1 і День 31 для Дослідження 2 і Дослідження 3). Результати, виражені у вигляді середнього об'єму пухлини (мм<sup>3</sup>) ( $\pm$ SD), відсотка виживаності і числа безпухлинних мишей, показані в Таблиці 25 для Дослідження 1, Таблиці 26 для Дослідження 2 і Таблиці 27 для Дослідження 3.

Таблиця 25

Середній об'єм пухлини, відсоток виживаності і число безпухлинних мишей в кожній групі лікування за результатами Дослідження 1 пухлин in vivo

Група лікування (n=5)	Об'єм пухлини, мм <sup>3</sup> середнє ( $\pm$ SD)		Вживаність, %		Безпухлинні миші
	День 17	День 23	День 42	День 23	День 42
	200 мкг/мишу	200 мкг/мишу	200 мкг/мишу	200 мкг/мишу	200 мкг/мишу
Без лікування	189 ( $\pm$ 110)	554 ( $\pm$ 317)	1/5 (20 %)	100 %	1/5 (20 %)
Ізотипічний контроль	86 ( $\pm$ 114)	515 ( $\pm$ 859)	2/5 (40 %)	60 %	2/5 (40 %)
H4H7798N	0 (0)	0 (0)	5/5 (100 %)	100 %	5/5 (100 %)
H4H9008P	14 ( $\pm$ 19)	205 ( $\pm$ 312)	3/5 (60 %)	100 %	3/5 (60 %)
H4H7795N2	89 ( $\pm$ 176)	445 ( $\pm$ 889)	3/5 (60 %)	80 %	3/5 (60 %)

[0236] Як показано в Таблиці 25 для Дослідження 1, у мишей, підданих лікуванню одним антитілом винаходу, H4H7798N, не розвивалися виявлювані пухлини під час проходження дослідження. Миші, піддані лікуванню H4H9008P, виявляли пролонгований знижений об'єм пухлини в порівнянні з контролями в Дні 17 і 24 дослідження, причому 3 з 5 мишей або 4 з 5 мишей були безпухлинними до кінця експерименту, відповідно. Навпаки, лікування з використанням одного з антитіл проти PD-1, H4H7795N2, не демонструвало суттєвої ефективності при зниженні об'єму пухлини в даному дослідженні в порівнянні з контролями. До Дня 23 дослідження, 1 з 5 мишей вмерла в групі з H4H7795N2 і 2 з 5 мишей вмерли в групі

лікування ізотипічним контролем. У групі без лікування і групі ізотипічного контролю декілька мишей виявляли спонтанну регресію пухлин (1 з 5 мишей і 2 з 5 мишей, відповідно).

Таблиця 26

Середній об'єм пухлини, відсоток виживаності і число безпухлинних мишей в кожній групі лікування за результатами Дослідження 2 пухлини in vivo

Група лікування (n=5)	Об'єм пухлини, мм <sup>3</sup> середнє (±SD)				Виживаність, %				Безпухлинні миші	
	Дні 17		День 24		День 17		День 24		День 31	
	5 мг/кг	10 мг/кг	5 мг/кг	10 мг/кг	5 мг/кг	10 мг/кг	5 мг/кг	10 мг/кг	5 мг/кг	10 мг/кг
Ізотипічний контроль	N/A	449 (±434)	N/A	824 (±858)	N/A	100 %	N/A	60 %	N/A	1/5 (20 %)
H4N7798N	17 (±38)	0 (0)	104 (±233)	0 (0)	100 %	100 %	100 %	100 %	4/5 (80 %)	5/5 (100 %)
H4N9008P	91 (±204)	12 (±28)	228 (±509)	96 (±215)	100 %	100 %	80 %	100 %	4/5 (80 %)	4/5 (80 %)
H4N9048P2	94 (±160)	10 (±21)	328 (±559)	67 (±150)	100 %	100 %	80 %	100 %	3/5 (60 %)	4/5 (80 %)
H4N7795N2	N/A	124 (±209)	N/A	359 (±657)	N/A	100 %	N/A	80 %	N/A	2/5 (40 %)

5 [0237] Як показано в Таблиці 26 для Дослідження 2, у мишей, підданих лікуванню одним антитілом винаходу, H4N7798N при 10 мг/кг, не розвивалися виявлювані пухлини під час проходження дослідження. Групи мишей, підданих лікуванню при 10 мг/кг або H4N9008P, або H4N9048P2, виявляли значно знижений об'єм пухлини в порівнянні з контролем в Дні 17 і 24 дослідження. Чотири з 5 мишей у кожній групі, підданій лікуванню 10 мг/кг або H4N9008P, або 10 H4N9048P2, були безпухлинними в День 31, у той час як у групі лікування ізотипічним контролем тільки 1 з 5 тварин була безпухлинною у результаті спонтанної регресії пухлини. Одне антитіло, тестоване при 10 мг/кг, H4N7795N2, демонструвало значно зменшений об'єм пухлини в порівнянні з контролем в Дні 17 і 24 дослідження, але це антитіло було найменш ефективним антитілом проти PD-1, причому тільки 2 з 5 мишей вижили наприкінці експерименту.

15 [0238] Дозозалежну відповідь при пригніченні пухлини при тестованих дозах (5 мг/кг і 10 мг/кг) спостерігали в групах, підданих лікуванню H4N7798N, H4N9008P і H4N9048P2. Терапія з використанням H4N7798N або H4N9008P при 5 мг/кг була менш ефективною, з 4 з 5 безпухлинних мишей наприкінці експерименту в День 21, у той час як 5 з 5 мишей залишалися безпухлинними в обох групах з дозою 10 мг/кг H4N7798N і H4N9008P.

20 [0239] Тест Даннета при двофакторному дисперсійному аналізі ANOVA множинних порівнянь показав, що відмінності в рості пухлин між групою, підданою лікуванню ізотипічним контрольним антитілом при 10 мг/кг, як еталон, і групами, підданими лікуванню при 10 мг/кг H4N7798N, H4N9008P або H4N9048P2, були статистично значимими зі значенням  $p < 0,005$ .  
25 Відмінності в рості пухлини між групою, підданою лікуванню ізотипічним контрольним антитілом при 10 мг/кг, як еталон, і групами, підданими лікуванню при 5 мг/кг H4N7798N, H4N9008P або H4N9048P2, були також статистично значимими зі значенням  $p < 0,05$ .

Таблиця 27

Середній об'єм пухлини, відсоток виживаності і число безпухлинних мишей в кожній групі лікування за результатами Дослідження 3 пухлин in vivo

Група лікування (n=7)	Об'єм пухлини, мм <sup>3</sup> середнє (±SD)				Виживаність, %				Безпухлинні миші	
	День 14		День 21		День 14		День 21		День 31	
	2,5 мг/кг	5 мг/кг	2,5 мг/кг	5 мг/кг	2,5 мг/кг	5 мг/кг	2,5 мг/кг	5 мг/кг	2,5 мг/кг	5 мг/кг
Ізотипічний контроль	N/A	94 (±44)	N/A	405 (±326)	N/A	100 %	N/A	86 %	N/A	0/7 (0 %)
H4H7798N	0 (0)	0 (0)	19 (±51)	13 (±35)	100 %	100 %	100 %	100 %	6/7 (86 %)	6/7 (86 %)
H4H9008P	41 (±68)	7 (±20)	87 (±123)	16 (±42)	100 %	100 %	100 %	100 %	4/7 (57 %)	6/7 (86 %)

[0240] Як показано в Таблиці 27 для Дослідження 3, 6 з 7 мишей, що піддавалися лікуванню одним антитілом винаходу, H4H7798N, або ще одним антитілом винаходу, H4H9008P, при 5 мг/кг були безпухлинними наприкінці експерименту, у той час як у групі ізотипічного контролю не було безпухлинних тварин. Одна пухлинонесуча миша в контрольній групі з IgG4 вмерла в День 17 після імплантації. Тільки 4 з 7 мишей, що піддавалися лікуванню H4H9008P при дозі 2,5 мг/кг, залишалися безпухлинними наприкінці експерименту. Відмінність в об'ємах пухлин на День 21 між групою з тестованими антитілами проти PD-1 і групою ізотипічного контролю була статистично значимою, як визначали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з апостеріорним критерієм множинного порівняння Даннета з  $p < 0,01$ . Усі чотири антитіла проти PD-1 були рівнозначно більш ефективними при дозі 5 мг/кг, ніж при дозі 2,5 мг/кг.

Приклад 10. Протипухлинні ефекти комбінації антитіла проти PD-1 і антагоніста VEGF на мишачій моделі раннього лікування пухлини

[0241] Модель раннього лікування пухлини була розроблена для тестування ефективності дії комбінації антитіла проти PD-1 і антагоніста VEGF. Для даної моделі, комбіновану терапію вводять незабаром після імплантації пухлини. В експерименті також застосовували антитіло проти PD-L1 окремо й у комбінації з антагоністом VEGF. Антитіло проти PD-1, застосовуване в даному експерименті, являло собою антитіло проти мишачого PD-1 клону "RPMI-14" із щурячим IgG2b (Bio X Cell, West Lebanon, NH). Антагоніст VEGF, застосовуваний у даному експерименті, являв собою афліберцепт (химерну молекулу на основі рецептора VEGF, також відому як "VEGF-пастка" або "VEGFR1R2-FcΔC1(a)", повний опис якої представлений в іншому розділі даного опису). Антитіло проти PD-L1, застосовуване в даному експерименті, являло собою моноклональне антитіло проти PD-L1 з  $V_H/V_L$ -последовностями антитіла "YW243.55S70" відповідно до US 20100203056A1 (Genentech, Inc.), з мишачим IgG2a, і мало перехресну реактивність з мишачим PD-L1.

[0242] Для даної експериментальної моделі,  $1,0 \times 10^6$  пухлинних клітин Colon-26 імплантували підшкірно мишам BALB/c у День 0. Починаючи в День 3, перед установленням вимірюваних пухлин, мишей піддавали лікуванню з використанням однієї з моно- або комбінованих терапій або контрольної комбінації, як наведено в Таблиці 28.

Таблиця 28

## Експериментальне дозування і групи лікування

Група лікування	Перший засіб	Другий засіб
Контрольна комбінація	IgG2a ізотипічний контроль (250 мкг, BO)	hFc контроль (250 мкг, ПШ)
тільки VEGF-пастка	IgG2a ізотипічний контроль (250 мкг, BO)	Афліберцепт (10 мг/кг, ПШ)
тільки проти PD-1	проти PD-1 mAb RPMI-14 (250 мкг, BO)	hFc контроль (250 мкг, ПШ)
тільки проти PD-L1	проти PD-L1 mAb (250 мкг, BO)	hFc контроль (250 мкг, ПШ)
VEGF-пастка + проти PD-1	проти PD-1 mAb RPMI-14 (250 мкг, BO)	Афліберцепт (10 мг/кг, ПШ)
VEGF-пастка + проти PD-L1	проти PD-L1 mAb (250 мкг, BO)	Афліберцепт (10 мг/кг, ПШ)

[0243] Різні терапії вводили в п'ятьох різних часових оцінках протягом двотижневого періоду (тобто ін'єкції в День 3, День 6, День 10, День 13 і День 19).

5 [0244] Тварин у кожній терапевтичній групі оцінювали з позицій появи пухлини, об'єму пухлини, середнього часу виживаності і числа безпухлинних тварин до Дня 50. Ступінь росту пухлини узагальнена на Фіг. 2 (криві росту пухлини) і Фіг. 3 (об'єм пухлини на День 28). Результати також узагальнені в Таблиці 29.

Таблиця 29

## Безпухлинні миші в групах лікування

Група лікування	№ безпухлинних тварин на День 50
Контрольна комбінація	0/10
тільки VEGF-пастка	3/10
тільки проти PD-1	4/10
тільки проти PD-L1	5/10
VEGF-пастка + проти PD-1	7/10
VEGF-пастка + проти PD-L1	9/10

10 [0245] Ріст пухлини значно знижувався у тварин, що піддаються лікуванню комбінацією VEGF-пастка + антитіло проти PD-1, у порівнянні з режимами лікування, що включають обидва терапевтичних засоби окремо (див. Фіг. 2 і 3). Крім того, виживаність суттєво зростала в групі VEGF-пастка + антитіло проти PD-1, причому щонайменше 70 % тварин виживали до дня 50 після імплантації пухлини. Навпаки, для груп з монотерапією антитілом проти PD-1 і VEGF-пасткою, виживаність до дня 50 складала тільки 40 і 30 %, відповідно (див. Фіг. 3 і Таблиця 29).

15 Приклад 11. Клінічне випробування повторного дозування з використанням антитіла проти PD-1 як єдиної терапії й у комбінації з іншими протипухлинними терапіями у пацієнтів з пухлинами на пізній стадії

20 [0246] Дане випробування являє собою дослідження з підвищенням дози антитіла проти PD-1, окремо або в комбінації з променевою терапією, циклофосфамідом або обома, у пацієнтів з пухлинами на пізній стадії. Ілюстративне антитіло проти PD-1 ("mAb"), застосовуване в даному Прикладі, містить HCVR з SEQ ID NO: 162 і LCVR з SEQ ID NO: 170.

Цілі клінічного дослідження

25 [0247] Первинною ціллю дослідження є характеризувати безпеку, переносимість, DLT mAb, що вводяться ВВ у вигляді монотерапії або в комбінації з цілеспрямованим опроміненням (нависно, щоб воно служило як імуностимулююча терапія більшою мірою, ніж, в основному, пухлиноаблятивна терапія), низькодозовим циклофосфамідом (терапією, що демонструвала інгібування регуляторних Т-клітинних відповідей), або обох варіантів, у пацієнтів з пухлинами на пізній стадії.

30 [0248] Вторинними цілями дослідження є: (1) визначити рекомендовану дозу для фази 2 (RP2D) mAb як монотерапії й у комбінації з іншими протипухлинними терапіями (цілеспрямованим опроміненням, низькодозовим циклофосфамідом або обома); (2) описати попередню протипухлинну активність mAb, окремо і з кожним партнером (партнерами) комбінації; (3) характеризувати ФК mAb як монотерапії й у комбінації з іншими протипухлинними

терапіями (цілеспрямованим опроміненням, низькодозовим циклофосфамідом або обома); і (4) оцінити імуногенність mAb.

Проект дослідження

[0249] Безпека буде оцінюватися в роздільних, стандартних 3+3 групах з підвищенням дози (при монотерапії, комбінації з променевою терапією, комбінації з циклофосфамідом і комбінації з променевою терапією плюс циклофосфамід). Вибір комбінованої терапії з опроміненням, циклофосфамідом або обома буде ґрунтуватися на оцінці дослідником кращого вибору терапії для індивідуального пацієнта при консультації зі спонсором. Щоб бути включеним у групу для променевої терапії, пацієнт повинен мати ушкодження, яке може бути безпечно опромінено і для якого опромінення при передбачених обмежених, паліативних дозах могло б вважатися відповідним у медичному відношенні, і щонайменше одне інше ушкодження, придатне для оцінки відповіді. Пацієнт зможе брати участь, тільки якщо в групі доступне вакантне місце для вибраного лікування.

[0250] Пацієнти будуть проходити через процедури скринінгу для визначення відповідності вимогам в інтервалі 28 днів перед початковим введенням mAb. Після включення пацієнтів у групу монотерапії mAb, включення наступних груп буде визначатися наявністю DLT у попередніх групах (тобто відсутністю DLT у групі з 3 пацієнтів або не більше ніж 1 DLT у розширеній групі з 6 пацієнтів) і доступністю вакантних місць для пацієнтів. Заплановані рівні дози при монотерапії складають 1, 3 або 10 мг/кг, що вводяться ВВ кожні 14 днів (2 тижні).

[0251] Як тільки періоди спостереження для однієї або обох груп із монотерапією по 1 мг/кг або 3 мг/кг mAb завершуються без DLT у групі з 3 пацієнтів або з не більше ніж 1 DLT у розширеній групі з 6 пацієнтів, пацієнти можуть бути включені в групу з комбінуванням циклофосфаміду або променевої терапії з mAb при такому ж рівні дози, як для монотерапії. Пацієнти можуть бути включені в групу з комбінацією mAb+циклофосфамід/променева терапія, як тільки періоди спостереження DLT як для групи з рівнем дози mAb + циклофосфамід, так і для групи з таким рівнем дози mAb + такий же режим променевої терапії завершуються без DLT у групі з 3 пацієнтів або з не більше ніж 1 DLT у розширеній групі з 6 пацієнтів.

[0252] Як тільки період спостереження DLT у групі з монотерапією 3 мг/кг mAb завершується без DLT у групі з 3 пацієнтів або не більше ніж з 1 DLT у розширеній групі з 6 пацієнтів, може бути також включена група з монотерапією 10 мг/кг mAb.

[0253] Групи з монотерапією mAb 3 мг/кг і 10 мг/кг будуть включені тільки тоді, коли необхідне число пацієнтів у групі з монотерапією попередньою дозою (тобто 1 мг/кг і 3 мг/кг, відповідно) пройде через день 28 періоду спостереження DLT без демонстрації максимальної переносимої дози (MTD) для цього рівня дози. Група 1 мг/кг mAb з комбінованим лікуванням буде включена тільки після завершення періоду спостереження DLT для групи з монотерапією 1 мг/кг. Комбіновані групи, що одержують 3 мг/кг mAb, будуть включені тільки тоді, коли необхідне число пацієнтів у відповідних комбінованих групах з 1 мг/кг пройде через період спостереження DLT без демонстрації MTD. Групи з потрійною комбінацією, що поєднують mAb з циклофосфамідом і режимом опромінення, будуть включені тільки тоді, коли необхідне число пацієнтів в обох відповідних групах з подвійною комбінацією при даному рівні дозування пройде період спостереження DLT без демонстрації MTD.

[0254] Таблиця 30 узагальнює групи з підвищенням дози, у які будуть включені пацієнти.

Таблиця 30

#### Можливі групи з підвищенням дози

n	Можлива задана група лікування
3-6	монотерапія 0,3 мг/кг mAb (буде включена, тільки якщо MTD <1 мг/кг mAb)
3-6	монотерапія 1 мг/кг mAb
3-6	монотерапія 3 мг/кг <sup>1</sup> mAb
3-6	монотерапія 10 мг/кг <sup>2</sup> mAb
3-6	1 мг/кг <sup>a</sup> mAb + променева терапія (6 Гр×5)
3-6	1 мг/кг <sup>a</sup> mAb + променева терапія (9 Гр×3)
3-6	3 мг/кг <sup>b</sup> (або MTD) mAb + циклофосфамід
3-6	3 мг/кг <sup>b</sup> (або MTD) mAb + променева терапія (6 Гр×5)
3-6	3 мг/кг <sup>b</sup> (або MTD) mAb + променева терапія (9 Гр×3)
3-6	3 мг/кг <sup>b</sup> (або MTD) mAb + променева терапія (6 Гр×5) + циклофосфамід
3-6	3 мг/кг <sup>b</sup> (або MTD) mAb + променева терапія (9 Гр×3) + циклофосфамід



[0255] DLT визначають як будь-яке з наступних: негематологічна токсичність (наприклад, увеїт або будь-яке інше ігАЕ) або гематологічна токсичність (наприклад, нейтропенія, тромбоцитопенія, фебрильна нейтропенія).

[0256] Максимальну переносиму дозу (MTD) визначають як найвищу дозу, при якій менше ніж третина розширеної групи з 6 пацієнтів випробовує DLT під час першого циклу лікування. Таким чином, MTD визначають як рівень дози відразу ж нижче рівня, при якому дозування зупиняють унаслідок наявності 2 або більше DLT у розширеній групі з 6 пацієнтів. Якщо збільшення дози не зупиняють внаслідок наявності DLT, буде вважатися, що MTD не була визначена. Можливо, що MTD може не визначатися в даному дослідженні, або для групи монотерапії, або для індивідуальних комбінованих груп. Додатково, можливо, що MTD для mAb можуть відрізнятися для монотерапії і кожного режиму комбінованого лікування.

Тривалість дослідження

[0257] Пацієнти будуть одержувати до 48 тижнів лікування, після яких буде 24-тижневий період наступного спостереження. Пацієнт буде одержувати лікування поки не завершиться 48-тижневий період лікування або до прогресування захворювання, неприйнятної токсичності, припинення згоди або настання відповідності ще одному критерію припинення участі в дослідженні. Після мінімального 24-тижневого лікування, пацієнти з підтвердженими повними відповідями (CR) можуть вибрати переривання лікування і продовження з усіма відповідними оцінками при дослідженні (наприклад, оцінками ефективності). Після мінімального 24-тижневого лікування, пацієнти з оцінками пухлинного навантаження стабільного захворювання (SD) або часткової відповіді (PR), у яких не відбулося змін протягом 3 послідовних пухлинних оцінок, можуть також вибрати переривання лікування і продовження з усіма відповідними оцінками при дослідженні (наприклад, оцінками ефективності).

Популяція дослідження

[0258] Цільова популяція для даного дослідження включає пацієнтів з пухлинами на пізній стадії, що не є кандидатами для стандартної терапії, не бажають проходити стандартну терапію або для яких не очікують сприятливого клінічного ефекту від доступної терапії; і пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями, які є невиліковними і які не мали реакції або продемонстрували прогресування пухлини, незважаючи на стандартну терапію.

[0259] Критерії включення. Пацієнт повинен відповідати наступним критеріям, щоб бути допущеним для включення в дослідження: (1) демонструвати прогресування солідної пухлини без альтернативної доступної терапевтичної опції стандартного лікування; (2) мати щонайменше 1 ушкодження для оцінки відповіді; пацієнтам, яким призначена променева терапія, потрібне щонайменше одне додаткове ушкодження, яке може бути безпечно опромінене при помірному показнику ушкоджень і для якого опромінення при передбачених обмежених, паліативних дозах буде вважатися відповідним у медичному відношенні; (3) мати показник загального стану по шкалі Східної об'єднаної онкологічної групи (ECOG)  $\leq 1$ ; (4) бути старше 18 років; (5) функція печінки: а) загальний білірубін  $\leq 1,5 \times$  верхня межа норми (ULN; якщо метастази в печінці  $\leq 3 \times$  мкл), б) трансамінази  $\leq 3 \times$  мкл (або  $\leq 5,0 \times$  мкл, якщо є метастази в печінці), с) лужна фосфатаза (ALP)  $\leq 2,5 \times$  мкл (або  $5,0 \times$  мкл, якщо є метастази в печінці); (6) функція нирок: креатинін у сироватці  $\leq 1,5 \times$  мкл; (7) число нейтрофілів (ANC)  $\geq 1,5 \times 10^9/\text{л}$ , число тромбоцитів  $\geq 75 \times 10^9/\text{л}$ ; (8) здатність надати підписану інформовану згоду; і (9) здатність і бажання додержуватися запланованих візитів, лікувальних планів, проходження лабораторних тестів і інших процедур, що мають відношення до дослідження.

[0260] Критерії виключення. Пацієнт, що відповідає будь-якому з наступних критеріїв, буде виключений з дослідження: (1) триваюче або нещодавнє (в інтервалі 5 років) очевидне свідчення значного аутоімунного захворювання, що вимагає лікування з використанням системних імуносупресорних терапій, які можуть препозитивно створити ризик для ігАЕ; (2) попереднє лікування засобом, що блокує шлях PD-1/PD-L1; (3) попереднє лікування іншими імуномодуючими засобами в інтервалі менше 4 тижнів або 4 періодів напівжиття, незалежно від того, який більше, перед першою дозою mAb; (4) приклади імуномодуляторів включають блокатори CTLA-4, 4-1BB (CD137), OX-40, терапевтичні вакцини або цитокінові терапії; (5) не піддавалися лікуванню метастази в мозку, що можуть вважатися активними; пацієнти з метастазами в мозку, що раніше піддавалися лікуванню, можуть взяти участь, за умови, що вони є стабільними (тобто без явних ознак прогресування при візуалізації, протягом щонайменше 4 тижнів перед першою дозою лікування при дослідженні, і будь-які неврологічні симптоми повернулися до вихідного рівня), і відсутні явні нові або збільшені метастази в мозку; (6) імуносупресорні дози кортикостероїдів ( $>10$  мг преднізону або еквівалента щодня) в інтервалі 4 тижнів до першої дози mAb; (7) тромбоз глибоких вен, тромбоемболія легеневої

артерії (включаючи асимптоматичну тромбоемболію, ідентифіковану при візуалізації) або інша тромбоемболічна подія в інтервалі 6 місяців, що передують першій дозі mAb; (8) активна інфекція, яка вимагає терапії, що включає відому інфекцію вірусом імунodefіциту людини, або активна інфекція вірусом гепатиту В або гепатиту С; (9) історія пневмонії в інтервалі останніх 5 років; (10) будь-яке дослідницьке або протипухлинне лікування в інтервалі 30 днів перед початковим введенням mAb; (11) історія документованих алергічних реакцій або гострої реакції гіперчутливості, що стосується лікувальних терапій з використанням антитіл у цілому або засобів, застосовуваних конкретно в дослідженні; (12) відома алергія на доксоциклін або тетрациклін (обережність унаслідок присутності слідових компонентів у mAb); (13) грудне вигодовування; (14) позитивний сироватковий тест на вагітність; (15) історія в інтервалі останніх 5 років інвазивного злоякісного новоутворення, що відрізняється від злоякісного новоутворення, яке піддається лікуванню в даному дослідженні, за винятком вирізанної/підданої абляції базальної або плоскоклітинної карциноми шкіри або раку шийки матки *in situ*, або інші місцеві пухлини, що вважаються вилікуваними за допомогою місцевого лікування; (16) гострі або хронічні психіатричні проблеми, які, при оцінці дослідником, роблять пацієнта непридатним для участі; і (17) триваюча сексуальна активність у чоловіків або жінок з дітородним потенціалом, що не бажають практикувати адекватну контрацепцію під час дослідження.

#### Терапії в рамках дослідження

[0261] mAb будуть надані у вигляді рідини в стерильних пляшечках одноразового використання. Кожна пляшечка буде містити об'єм, достатній для забору 10 мл mAb при концентрації, що дорівнює 25 мг/мл. Інструкції по дозі препарату надані в довідковому посібнику з дослідження. mAb будуть вводитися в амбулаторній установі у вигляді 30-хвилинної ВВ інфузії. Кожна доза для пацієнта буде залежати від індивідуальної маси тіла. Доза mAb повинна регулюватися кожен цикл з урахуванням змін маси тіла  $\geq 10\%$ . mAb будуть вводитися окремо й у комбінації з опроміненням і/або циклофосфамідом.

#### Монотерапія

[0262] mAb будуть вводитися в амбулаторній установі за допомогою ВВ інфузії протягом 30 хвилин кожні 14 днів протягом 48 тижнів (тобто у Дні 1,  $15 \pm 3$ ,  $29 \pm 3$  і  $43 \pm 3$  56-денного циклу). Плановані режими монотерапії для призначення можуть включати: (i) ВВ інфузія 1 мг/кг протягом 30 хвилин кожні 14 днів протягом 48 тижнів; (ii) інфузія 3 мг/кг протягом 30 хвилин кожні 14 днів протягом 48 тижнів; (iii) інфузія 10 мг/кг протягом 30 хвилин кожні 14 днів протягом 48 тижнів; і (iv) інфузія 0,3 мг/кг протягом 30 хвилин кожні 14 днів протягом 48 тижнів (якщо визначено, що MTD нижче 1 мг/кг).

#### Комбінована терапія

[0263] Супутні променева терапія і циклофосфамід будуть застосовуватися по призначенню і їх застосовність, доза, дозові модифікації, зниження або затримки, а також будь-які потенційні АЕ, що є результатом їх застосування, будуть відслідковуватися поряд з такими ж діями для mAb.

[0264] Спільне введення mAb і опромінення. mAb будуть вводитися за допомогою ВВ інфузії протягом 30 хвилин кожні 14 днів протягом 48 тижнів у комбінації з променевою терапією від дня 8 до дня 12. Плановані режими комбінації mAb і променевої терапії можуть включати:

інфузія 1 мг/кг mAb протягом 30 хвилин кожні 14 днів протягом 48 тижнів плюс 30 Гр променевої терапії (6 Гр  $\times$  5 разів/тиждень; дається 1 тиждень після першої дози mAb, переважно в наступні дні),

інфузія 1 мг/кг mAb протягом 30 хвилин кожні 14 днів протягом 48 тижнів плюс 27 Гр променевої терапії (9 Гр  $\times$  3 рази/тиждень; дається 1 тиждень після першої дози mAb, переважно не в наступні дні),

інфузія 3 мг/кг mAb протягом 30 хвилин кожні 14 днів протягом 48 тижнів плюс 30 Гр променевої терапії (6 Гр  $\times$  5 разів/тиждень; дається 1 тиждень після першої дози mAb, переважно в наступні дні),

інфузія 3 мг/кг mAb протягом 30 хвилин кожні 14 днів протягом 48 тижнів плюс 27 Гр променевої терапії (9 Гр  $\times$  3 рази/тиждень; дається 1 тиждень після першої дози mAb, переважно не в наступні дні).

[0265] Пацієнти будуть одержувати або 30 Гр, які даються у вигляді 5 фракцій по 6 Гр, що вводяться щодня, починаючи з 1 тижня після першої дози mAb, або 27 Гр, які даються у вигляді 3 фракцій по 9 Гр, що вводяться в кожний наступний день, починаючи з 1 тижня після першої дози mAb. Ушкодження, вибране для опромінення, повинно являти собою ушкодження, яке може бути безпечно опромінене фокусним опромінюванням при щадному показнику ушкодження (ушкоджень) і для якого опромінення при передбачених обмежених, паліативних дозах буде вважатися придатним з медичної точки зору. Цільова доза для пацієнта буде

основана на призначенні групи і повинна відповідати вимогам до нормальної тканини, згідно зі стандартною практикою опромінення в онкології. Лікування при встановленому в протоколі режимі дозування дозволяється, тільки якщо має місце відповідність критеріям для нормальної тканини. Якщо не можна досягти відповідності критеріям для нормальної тканини, при двох

режимах променевої терапії, встановлених у протоколі, пацієнт не може бути допущений для включення в групу комбінованого з опроміненням лікування в даному дослідженні.

[0266] Спільне введення mAb і циклофосфаміду. mAb будуть вводитися за допомогою ВВ інфузії протягом 30 хвилин кожні 14 днів (2 тижні) протягом 48 тижнів у комбінації з 200 мг/м<sup>2</sup> циклофосфаміду кожні 14 днів для всього 4 доз. Кожна з 4 доз циклофосфаміду буде вводитися за 1 день перед кожною з перших 4 доз mAb (Дні 1, 14, 28 і 42 першого 56-денного циклу).

[0267] Незважаючи на те, що циклофосфамід успішно застосовувався супутнім чином разом з іншими лікарськими засобами, швидкість метаболізму і лейкопенічна активність циклофосфаміду, як повідомляють, збільшуються за допомогою постійного введення високих доз фенобарбіталу. Лікування циклофосфамідом викликає виражене й стійке інгібування холінергичної активності, таким чином, потенціюючи ефект від сукцинільхолінхлориду. Планований режим комбінації mAb і циклофосфаміду для призначення являє собою:

200 мг/м<sup>2</sup> циклофосфаміду кожні 14 днів (Дні 1, 14, 28 і 42 першого 56-денного циклу) при всього 4 дозах плюс інфузія 3 мг/кг mAb протягом 30 хвилин кожні 14 днів протягом 48 тижнів (надана доза монотерапії дорівнює 3 мг/кг < MTD; якщо 3 мг/кг > MTD, доза буде дорівнювати 1 мг/кг).

[0268] Спільне введення mAb, опромінення і циклофосфаміду. Планований режим комбінації mAb, опромінення і циклофосфаміду включає:

200 мг/м<sup>2</sup> циклофосфаміду кожні 14 днів (Дні 1, 14, 28, і 42 першого 56-денного циклу) при всього 4 дозах плюс 27 Гр променевої терапії (9 Гр × 3 рази/тиждень; що дається 1 тиждень після першої дози mAb, переважно не в наступні дні), або

30 Гр променевої терапії (6 Гр × 5 разів/тиждень; що дається 1 тиждень після першої дози mAb, переважно в наступні дні) плюс інфузія 3 мг/кг mAb протягом 30 хвилин кожні 14 днів протягом 48 тижнів (надана доза монотерапії дорівнює 3 мг/кг < MTD; якщо 3 мг/кг > MTD, доза буде дорівнювати 1 мг/кг).

Змінні дослідження

[0269] Первинні змінні. Первинні змінні безпеки включають появу DLT, появу і тяжкість несприятливих явищ, що виникли на фоні лікування (TEAE), і аномальні результати лабораторних аналізів протягом 48 тижнів лікування.

[0270] Вторинні змінні. Ключові вторинні змінні включають наступне: концентрацію в сироватці і фармакокінетику (ФК) mAb.

Протипухлинну активність оцінюють з використанням відповідних критеріїв для призначення: критерії оцінки відповіді при солідних пухлинах, виміряні за допомогою комп'ютерної томографії (КТ) або магнітно-резонансної томографії (МРТ).

Інші критерії оцінки також повинні застосовуватися для конкретних пухлин, для яких вимірювання по RECIST не є стандартними.

Критерії оцінки відповіді, що стосується імунітету (irRC), застосовувані до даних вимірювань по RECIST.

В усіх випадках, irRC буде направляючим інструментом для визначення прогресування захворювання (PD), SD, CR або PR. Стандартні дані RECIST будуть також зібрані для інформаційних цілей.

Антитіла проти mAb

Методики дослідження

[0271] Наступні методики будуть виконуватися при скринінгу з метою визначення відповідності вимогам до дослідження або характеристикації вихідної популяції: (i) сироватковий  $\beta$ -HCG (результат повинен бути  $\leq 72$  години до першої дози); (ii) збирання архівованого пухлинного матеріалу: після підписання пацієнтом інформованої згоди, пацієнту буде запропоновано надати будь-які доступні раніше зібрані пухлинні зразки; (iii) МРТ мозку: МРТ мозку потрібна при скринінгу, якщо не була проведена протягом попередніх 60 днів; і (iv) рентгенограма грудної клітки: рентгенограма грудної клітки потрібна при скринінгу, якщо не була проведена протягом попередніх 60 днів.

[0272] Методики оцінки ефективності дії. КТ або МРТ для оцінки пухлини буде виконуватися при візиті на скринінг (в інтервалі 28 днів перед інфузією) і під час кожного циклу (приблизно кожні 8 тижнів) у День  $56 \pm 3$ , і коли передбачають прогресування захворювання. Додатково, для пацієнтів, у яких не було прогресування при дослідженні, оцінка пухлини буде виконуватися протягом візитів 3, 5 і 7 наступного спостереження. Як тільки зроблений вибір застосування

скануючої КТ або МРТ, наступні оцінки будуть проводитися з використанням такої ж модальності.

[0273] Оцінка пухлинної відповіді буде виконуватися відповідно до критеріїв оцінки відповіді, що належить до імунітету (irRC; Nishino 2013). Оцінка відповідно до критеріїв оцінки відповіді при солідних пухлинах (RECIST) версія 1.1 (Eisenhauer 2009) також буде проводитися як підтверджуюче обстеження; однак, первинне визначення прогресування захворювання для індивідуального пацієнта буде зроблене відповідно до irRC. Вимірювані ушкодження, вибрані як цільові ушкодження для оцінок по RECIST, також будуть включені як показник ушкоджень для оцінок згідно з irRC.

[0274] Методики забезпечення безпеки. Будуть зібрані основні показники стану організму, які включають температуру, артеріальний тиск у стані спокою, пульс і дихання. При плануванні проведення в той же візит, що й інші методики, вимірювання основних показників стану організму повинно проводитися перед клінічними лабораторними оцінками, ФК або пошуковим збиранням зразків. Під час циклу 1, основні показники стану організму будуть реєструватися в Дні лікування, перед лікуванням, наприкінці інфузії, кожні 30 хвилин протягом перших 4 годин після інфузії і при 6 і 8 годинах після введення досліджуваного лікарського засобу. При наступних циклах, основні показники стану організму в Дні лікування будуть оцінюватися і документуватися перед інфузією, кожні 30 хвилин протягом перших 2 годин і потім щогодини до 4 годин після введення досліджуваного лікарського засобу.

[0275] При візитах буде виконуватися ретельний повний або обмежений медичний огляд. Повний медичний огляд буде включати обстеження шкіри, голови, очей, носа, горла, шиї, суглобів, легень, серця, пульсу, черевної порожнини (включаючи печінку і селезінку), лімфатичних вузлів і кінцівок, а також коротке неврологічне обстеження. Обмежений медичний огляд буде включати легені, серце, черевну порожнину і шкіру.

[0276] Буде виконуватися стандартна ЕКГ у 12 відведеннях. Будь-які результати ЕКГ, що на думку дослідника являють собою клінічно значиму зміну (погіршення) у порівнянні з вихідним значенням, будуть розглядатися як АЕ, реєструватися і спостерігатися.

[0277] Аналітичні тести на імунологічну безпеку складаються з визначення ревматоїдного фактора (RF), тиреостимулюючого гормону (TSH), С-реактивного білка (CRP) і титру і розподілу антиядерного антитіла (ANA). Якщо під час проходження дослідження, спостерігають 4-кратне або більш високе збільшення від вихідного рівня по RF або ANA або аномальні рівні TSH або CRP, можуть також проводитися наступні тести: на антитіло проти ДНК, антитіло проти антигену А синдрому Шегрена (SSA) (Ro), антитіло проти антигену В синдрому Шегрена (SSB) (La), антитіло до тиреоглобуліну, антитіло проти LKM, антитіло проти фосфоліпіду, антитіло проти острівцевих клітин, антитіло проти нейтрофілів C3, C4, CH50 у цитоплазмі. Активованій частковий тромбoplastиновий час (aPTT) і Міжнародний коефіцієнт нормалізації (INR) будуть аналізуватися місцевою лабораторією лікувальної установи.

#### Безпека

[0278] Несприятливе явище (AE) являє собою будь-яке небажане медичне явище у пацієнта, якому введений досліджуваний лікарський засіб, що може мати або не мати причинно-наслідковий зв'язок з досліджуваним лікарським засобом. Отже, АЕ являє собою несприятливий і небажаний (що включає аномальний лабораторний результат) симптом або захворювання, які тимчасово асоційовані з застосуванням досліджуваного лікарського засобу, незалежно від того, чи вважають їх такими, що стосуються досліджуваного лікарського засобу. АЕ також включає будь-яке погіршення (тобто будь-яку клінічно значиму зміну частоти і/або інтенсивності) раніше існуючого стану, що тимчасово асоційована з застосуванням досліджуваного лікарського засобу. Прогресування основного злоякісного новоутворення не буде вважатися АЕ, якщо воно явним чином є наслідком типової схеми прогресування основного злоякісного новоутворення (включаючи період дії, уражені органи і т. д.). Клінічні симптоми прогресування можуть бути представлені в звіті як АЕ, якщо симптом не може бути визначений як винятково обумовлений прогресуванням основного злоякісного новоутворення або не відповідає очікуваній схемі прогресування для захворювання при дослідженні.

[0279] Серйозне несприятливе явище (SAE) являє собою будь-яке небажане медичне явище, яке при будь-якій дозі приводить до смерті, являє загрозу для життя, вимагає госпіталізації в стаціонар або пролонгації існуючої госпіталізації, приводить до стійкої або значної непрацездатності/недієздатності (суттєвого порушенню здатності виконувати звичайні життєві функції), є уродженою аномалією/патологією пологів.

[0280] Інформація по всіх АЕ і SAE у пацієнта буде реєструватися.

План статистичного аналізу

[0281] Підвищення досліджуваної дози основане на традиційному дизайні 3+3, з 3-6 пацієнтами, віднесеними до рівня дози. Точне число пацієнтів, включених у дослідження, буде залежати від числа спостережуваних заданих протоколом DLT і необхідності розширювати задані застосовувані рівні доз або відкривати додаткові групи при більш низьких дозових рівнях.

5 Після необхідного початкового включення в наступну групу при нарощуванні дози, включення в кожну з попередніх груп нижче MTD для такого лікування буде розширене (якщо раніше не розширювали під час нарощування) до всього 6 пацієнтів.

[0282] Дані будуть узагальнені з використанням тільки описової статистики. У цілому, дані будуть узагальнюватися по дозових рівнях і комбінаціях. Узагальнення оцінок безпеки і їх

10 аналізів будуть виконуватися на основі вибірки для аналізу безпеки (SAF). Первинний аналіз безпеки буде оснований на небажаних явищах (AE), що виникли на фоні лікування (TEAE).

[0283] Даний винахід не буде обмежуватися по обсягу конкретними варіантами здійснення, описаними в даному документі. Безсумнівно, різні модифікації винаходу на доповнення до модифікацій, описаних тут, будуть зрозумілі фахівцям у даній галузі з попереднього опису і

15 супровідних креслень. Такі модифікації мають на увазі як такі, що входять у межі обсягу прикладеної формули винаходу.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

20 1. Ізольоване антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що специфічно зв'язується з людським білком програмованої смерті-1 (PD-1), де ізольоване антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить три ділянки важкого ланцюга, що визначають комплементарність (CDR) (HCDR1, HCDR2 та HCDR3) варіабельної ділянки важкого ланцюга (HCVR), що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 162, і три CDR легкого ланцюга (LCDR1, LCDR2 та LCDR3) варіабельної ділянки легкого ланцюга (LCVR), що має амінокислотну

25 послідовність SEQ ID NO: 170.

2. Ізольоване антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 1, де еталонне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент має одну або декілька з наступних властивостей:

(a) блокує зв'язування білка PD-1 людини з PD-L1 з IC<sub>50</sub>, меншою ніж 3 нМ, виміряною методом конкурентного сендвіч-аналізу ELISA при 25 °C;

(b) зв'язується з мономерним PD-1 людини з рівноважною константою дисоціації для зв'язування (K<sub>D</sub>), меншою ніж приблизно 50 нМ, виміряною при аналізі методом поверхневого плазмонного резонансу при 37 °C;

(c) зв'язується з мономерним PD-1 людини з K<sub>D</sub>, меншою ніж приблизно 12 нМ, при аналізі методом поверхневого плазмонного резонансу при 25 °C;

(d) зв'язується з мономерним PD-1 мавпи з K<sub>D</sub>, меншою ніж приблизно 8,5 нМ, при аналізі методом поверхневого плазмонного резонансу при 25 °C;

(e) зв'язується з мономерним PD-1 людини з періодом половинної дисоціації (t<sub>1/2</sub>), більшим ніж приблизно 6,3 хвилини, виміряним при аналізі методом поверхневого плазмонного резонансу при 25 °C; і

(f) зв'язується з мономерним PD-1 людини з періодом половинної дисоціації (t<sub>1/2</sub>), більшим ніж приблизно 0,9 хвилини, виміряним при аналізі методом поверхневого плазмонного резонансу при 37 °C.

3. Ізольоване антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 1 або п. 2, де:

45 (a) HCDR1 має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 164;

(b) HCDR2 має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 166;

(c) HCDR3 має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 168;

(d) LCDR1 має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 172;

50 (e) LCDR2 має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 174; і

(f) LCDR3 має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 176.

4. Ізольоване антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. 1-3, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить HCVR SEQ ID NO: 162 і/або LCVR SEQ ID NO: 170.

5. Ізольоване антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. 1-4, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить важкий ланцюг і легкий ланцюг, де важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 330.

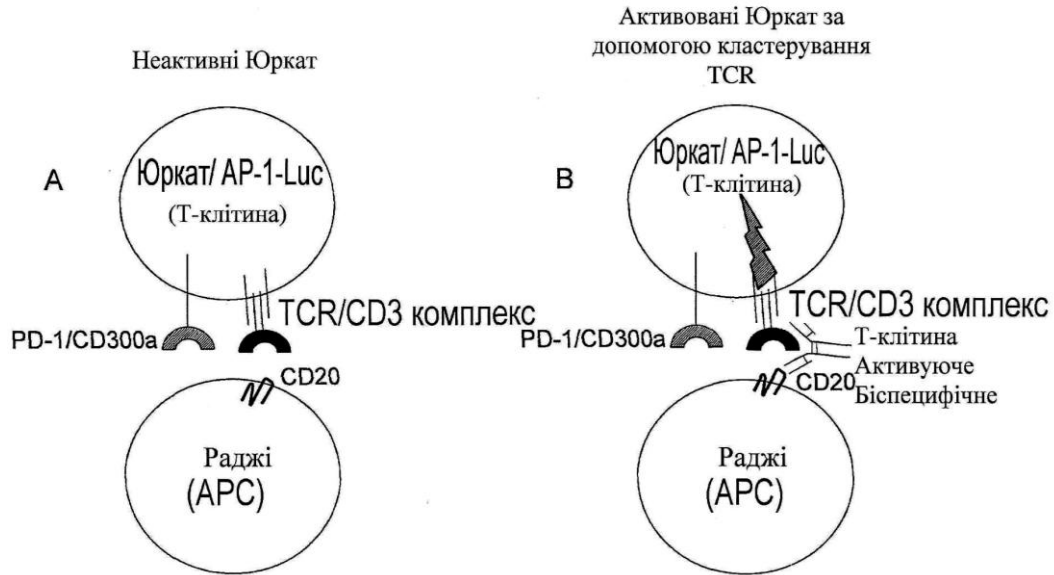
6. Ізольоване антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. 1-4, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить важкий ланцюг і легкий ланцюг, де легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 331.

7. Ізольоване антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. 1-4, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить пару амінокислотних послідовностей SEQ ID NO: 330/331 важкого ланцюга/легкого ланцюга.
8. Ізольоване антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. 1-7, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент являє собою мультиспецифічну антигензв'язувальну молекулу.
9. Ізольоване антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що специфічно зв'язується з людським білком програмованої смерті-1 (PD-1), де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 330 важкого ланцюга та амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 331 легкого ланцюга.
10. Фармацевтична композиція, яка містить ізольоване антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що зв'язується з PD-1 людини відносно будь-якого з пп. 1-9, і фармацевтично прийнятний носій або розріджувач.
11. Ізольована полінуклеотидна молекула, яка містить полінуклеотидну послідовність, що кодує HCVR антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, як наведено в будь-якому з пп. 1-9.
12. Ізольована полінуклеотидна молекула, яка містить полінуклеотидну послідовність, що кодує LCVR антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, як наведено в будь-якому з пп. 1-9.
13. Вектор, який містить полінуклеотидну послідовність за п. 11 або 12.
14. Клітина, яка експресує вектор за п. 13.
15. Спосіб продукування антитіла проти PD-1 або його антигензв'язувального фрагмента, що включає вирощення клітини-хазяїна за п. 14 в умовах, які забезпечують вироблення антитіла або фрагмента антитіла, і витягання антитіла і фрагмента антитіла, продукованого таким чином.
16. Спосіб за п. 15, де клітина-хазяїн являє собою клітину CHO.
17. Спосіб за п. 15 або п. 16, який додатково включає отримання антитіла або антигензв'язувального фрагмента у вигляді фармацевтичної композиції з вмістом прийнятного носія.
18. Антитіло проти PD-1 або його антигензв'язувальний фрагмент може бути отримано у спосіб за п. 15 або п. 16.
19. Застосування ізольованого антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за будь-яким з пп. 1-9 або фармацевтичної композиції за п. 10 для посилення імунної відповіді у суб'єкта.
20. Застосування ізольованого антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за будь-яким з пп. 1-9 або фармацевтичної композиції за п. 10 для інгібування Т-регуляторних (Treg) клітин у суб'єкта.
21. Застосування ізольованого антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за будь-яким з пп. 1-9 або фармацевтичної композиції за п. 10 для посилення активації Т-клітин у суб'єкта.
22. Застосування за будь-яким з пп. 19-21, де суб'єкт має захворювання або розлад, що включає рак мозку, нирковоклітинну карциному, рак яєчника, рак простати, рак товстої кишки, недрібноклітинний рак легень, плоскоклітинний рак ділянки голови і шиї, рак ободової і прямої кишок, рак шлунка, рак нирки, рак молочної залози, множинну мієлому або меланому.
23. Застосування за будь-яким з пп. 19-21, де суб'єкт має вірусну інфекцію, яка включає ВІЛ, HCV, HBV, HPV, LCMV і SIV або їхню комбінацію.
24. Застосування ізольованого антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за будь-яким з пп. 1-9 або фармацевтичної композиції за п. 10 для інгібування росту пухлини або пухлинних клітин у суб'єкта.
25. Застосування за п. 24, де пухлина або пухлинна клітина включає рак мозку, нирковоклітинну карциному, рак яєчника, рак простати, рак товстої кишки, недрібноклітинний рак легень, плоскоклітинний рак ділянки голови і шиї, рак ободової і прямої кишки, рак шлунка, рак нирки, рак молочної залози, множинну мієлому або меланому.
26. Застосування за будь-яким з пп. 19-25, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент або фармацевтичну композицію, що містить антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, вводять суб'єкту в комбінації з другим терапевтичним засобом або терапією.
27. Застосування за п. 26, де другий терапевтичний засіб або терапія включає NSAID, кортикостероїд, антитіло до різних Т-клітинних співінгібіторів, антитіло до пухлиноспецифічного антигену, інгібітор індоламін-2,3-діоксигенази (IDO), Ang2-інгібітор, вакцину проти раку, інгібітор рецептора епідермального фактора росту (EGFR), інгібітор трансформуючого фактора росту бета (TGFβ), антитіло до PD-L1, інгібітор CTLA-4, інгібітор LAG3, інгібітор TIM3, харчову добавку, антиоксидант, антагоніст VEGF, антитіло проти VEGF, низькомолекулярний інгібітор

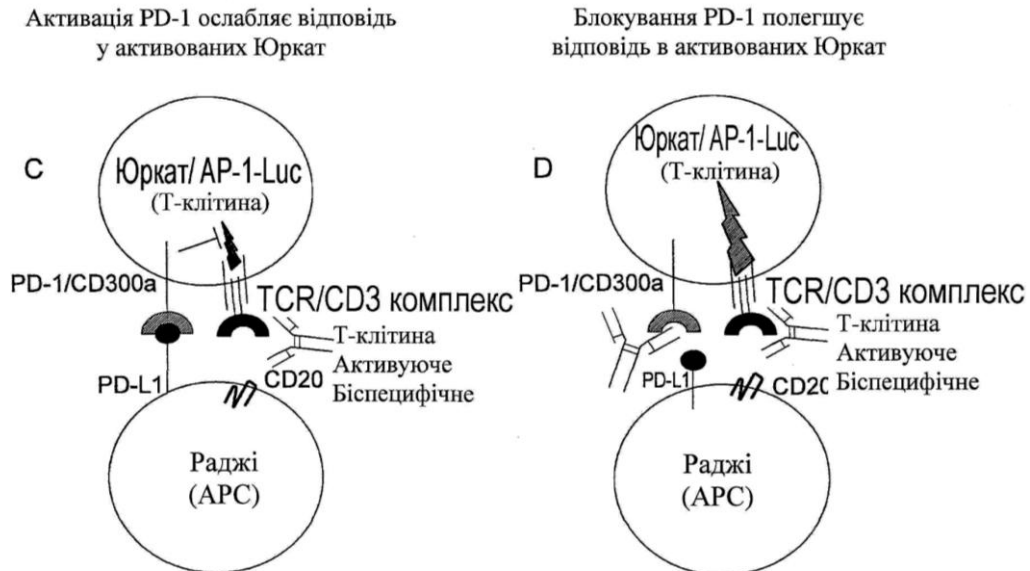
кінази рецептора VEGF, злитий білок, що інгібує VEGF, хірургічне втручання, опромінювання, хіміотерапевтичний засіб, цитотоксичний засіб або їхню комбінацію.

28. Застосування за будь-яким з пп. 19-27, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент вводять підшкірно, внутрішньовенно, внутрішньошкірно, внутрішньоочеревинно, перорально, внутрішньом'язово або інтракраніально.

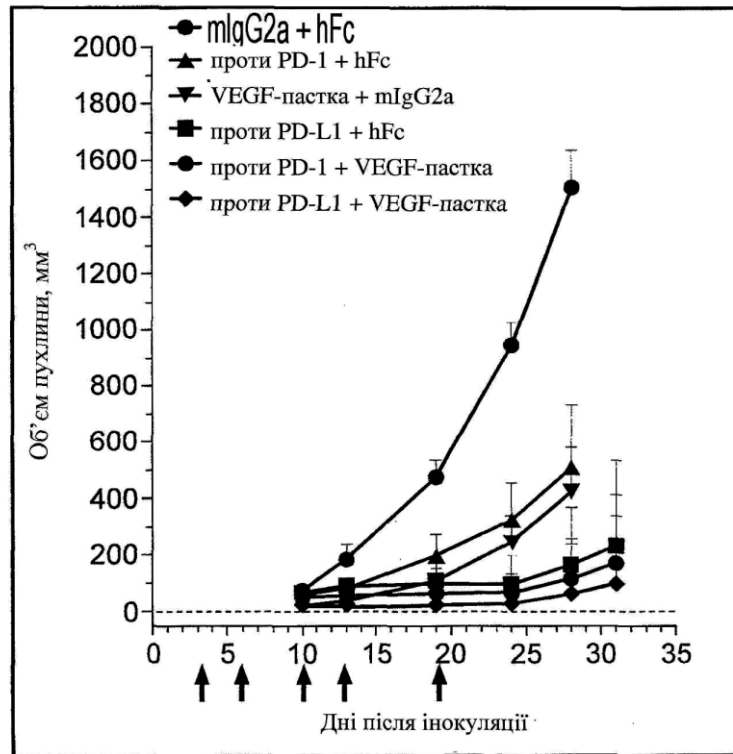
29. Застосування за будь-яким з пп. 19-28, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент вводять при дозі, що дорівнює від приблизно 0,1 мг/кг маси тіла до приблизно 60 мг/кг маси тіла суб'єкта.



Фіг. 1

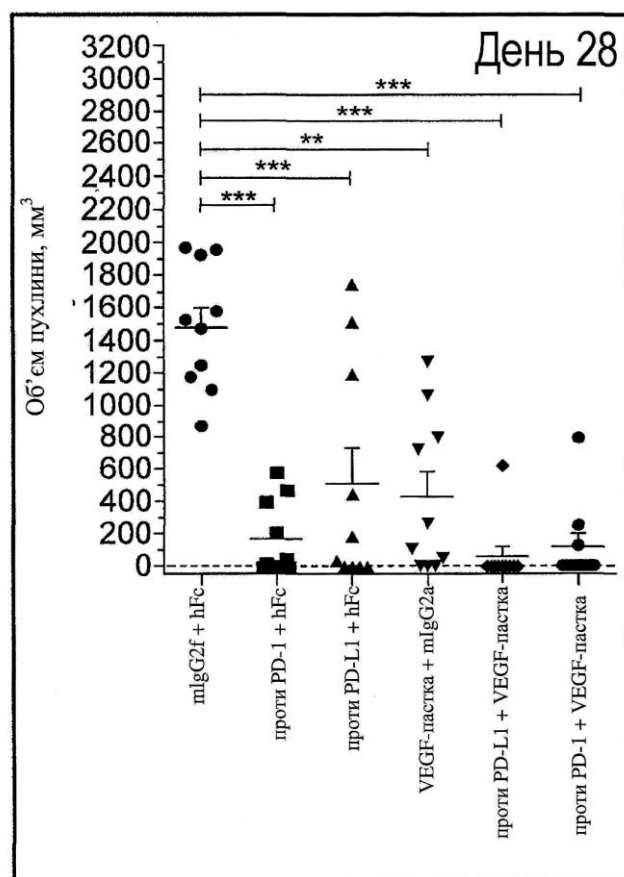


Фіг. 1 (продовження)



Фіг. 2





Фіг. 3