



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 123826

(13) C2

(51) МПК

C07K 16/28 (2006.01)

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

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2018 04633	(72) Винахідник(и):	Зеебер Стефан (DE), Ліфке Валеріа (DE), Фішер Єнс (DE), Вайзер Барбара (DE), Вюнше Ільдико (DE), Пльоттнер Олівер (DE), Цвік Адріан (DE), Жорж Гуй (DE), Денгль Стефан (DE), Левітські Віктор (CH), Кляйн Крістіан (CH), Кодаррі Дік Лаура (CH), Фенн Себастьян (DE), Бенц Йорг (DE)
(22) Дата подання заявки:	29.09.2016	(73) Володілець (володільці):	Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ, Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	10.06.2021	(74) Представник:	Новікова Лідія Аркадіївна, реєстр. №36
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	15188061.4	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2012/145493 A1, 26.10.2012 WO 2011/110621 A1, 15.09.2011 WO 2011/110604 A1, 15.09.2011 WO 2010/036959 A2, 01.04.2010
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	02.10.2015		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.09.2018, Бюл.№ 18		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	09.06.2021, Бюл.№ 23		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2016/073248, 29.09.2016		

## (54) АНТИТИЛА ДО PD1 ТА СПОСОБИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Даний винахід стосується антитіла до PD1 та його застосування.

UA 123826 C2



Даний винахід належить до антитіл до PD1 (білок запрограмованої смерті 1) та до способів їх застосування.

#### ПОПЕРЕДНІЙ РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

##### PD-1

5 Костимуляція або надання двох відмінних сигналів Т-клітинам є загальноприйнятою моделлю лімфоцитарної активації Т-лімфоцитів, що покоються, за допомогою антигенпрезентуючих клітин (APC) (Lafferty et al., Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 53: 27-42 (1975)).

Згідно з даною моделлю додатково запропоноване розрізнення імунотолерантності відносно "свого" і "не свого" (Bretscher et al., Science 169: 1042-1049 (1970); Bretscher, P.A., P.N.A.S. USA 96: 185-190 (1999); Jenkins et al., J. Exp. Med. 165: 302-319 (1987)). Первинний сигнал, або антигенспецифічний сигнал, трансдукується через Т-клітинний рецептор (TCR) після розпізнавання чужорідного антигенного пептиду, презентованого в контексті головного комплексу гістосумісності (MHC). Вторинний або костимулюючий сигнал доставляється до Т-клітин костимулюючими молекулами, що експерсуються на антигенпрезентуючих клітинах (APC), і він індукує Т-клітини до стимуляції клонального розмноження, секреції цитокінів та ефекторної функції (Lenschow et al., Ann. Rev. Immunol. 14:233 (1996)). У відсутності костимуляції Т-клітини можуть ставати несприйнятливими до стимуляції антигеном, не формують ефективної імунної відповіді, і додатково це може призводити до виснаження популяції або толерантності по відношенню до чужорідних антигенів.

20 Дана проста модель двох сигналів може являти собою надмірне спрощення, так як насправді сила сигналу TCR має кількісний вплив на активацію і диференціацію Т-клітин (Viola et al., Science 273: 104-106 (1996); Sloan-Lancaster, Nature 363: 156-159 (1993)). Крім того, активація Т-клітин може відбуватися навіть за відсутності костимулюючих сигналів, якщо сила сигналу TCR є високою. Більш важливо те, що Т-клітини одержують як позитивні, так і негативні вторинні костимулюючі сигнали. Регуляція таких позитивних і негативних сигналів є критично важливою для максимізації захисних імунних відповідей хазяїна при підтриманні імунологічної толерантності та попередженні аутоімунітету.

Негативні вторинні сигнали, очевидно, є необхідними для індукції толерантності Т-клітин, тоді як позитивні сигнали стимулюють активацію Т-клітин. У той час як проста модель двох сигналів все ще надає спроможне пояснення для наївних лімфоцитів, імунна відповідь хазяїна являє собою динамічний процес, і костимулюючі сигнали також можуть бути надані для Т-клітин, що піддаються впливу антигену.

Механізм костимулювання виявляє терапевтичний інтерес, так як було показано те, що маніпулювання костимулюючими сигналами надає засіб або для посилення, або для припинення імунної відповіді на клітинній основі. Нещодавно відкрили те, що дисфункція або анергія Т-клітин відбувається паралельно з індукованою і такою, що підтримується, експресією інгібіуючого рецептора - поліпептиду запрограмованої смерті 1 (PD-1). У результаті, терапевтичний вплив на PD-1 є сферою живого інтересу.

Білок запрограмованої смерті 1 (PD-1) являє собою інгібуючого члена сімейства рецепторів CD28, яке також включає CD28, CTLA-4 (антиген 4 цитотоксичних Т-лімфоцитів), ICOS (Т-клітинний костимулятор, що індукується) і BTLA. PD-1 експресується на активованих В-клітинах, Т-клітинах і мієлоїдних клітинах (Agata et al, вище; Okazaki et al (2002) Curr. Opin. Immunol. 14: 391779-82; Bennett et al. (2003) J Immunol 170:711-8). Вихідні члени сімейства - CD28 і ICOS - були відкриті за функціональними ефектами на збільшення проліферації Т-клітин після додавання моноклональних антитіл (Hutloff et al (1999) Nature 397:263-266; Hansen et al (1980) Immunogenics 10:247-260). PD-1 був відкритий за допомогою скринінгу на диференційну експресію в апоптичних клітинах (Ishida et al (1992) EMBO J 11:3887-95). Інші члени сімейства - CTLA-4 і BTLA - були відкриті за допомогою скринінгу на диференційну експресію в цитотоксичних Т-лімфоцитах і клітинах TH1 (Т-хелпер 1-го типу) відповідно. Всі з CD28, ICOS і CTLA-4 мають неспарений залишок цистеїну, що забезпечує гомодимеризацію. На відміну від цього, припускається те, що PD-1 існує у вигляді мономера, не маючи неспареного залишку цистеїну, характерного у інших членів сімейства CD28.

Ген PD-1 кодує 55 кДа трансмембранний білок типу I, який є частиною надсімейства генів Ig (Agata et al. (1996) bit Immunol 8:765-72). PD-1 містить мембранний проксимальний імунорецепторний тирозиновий інгібуючий мотив (ITIM) і мембранний дистальний оснований на тирозині перемикаючий мотив (ITSM) (Thomas, MX. (1995) J Exp A4edW, : 1953-6; Vivier, E and Daeron, M (1997) Immunol Today 18:286-91). Не дивлячись на структурну схожість з CTLA-4, у PD-1 відсутній мотив MYPPPY, який є критично важливим для зв'язування B7-1 та B7-2. Ідентифікували два ліганди PD-1 - PD-L1 і PD-L2, для яких була показана знижуюча регуляція активації Т-клітин при зв'язуванні з PD-1 (Freeman et al (2000) J Exp Med 192: 1027-34; Latchman

et al (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter et al (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43). І PD-L1, і PD-L2 є гомологами B7, які зв'язуються з PD-1, але не зв'язуються з іншими членами сімейства CD28. Одного ліганду PD-1 - PD-L1 - багато при цілій низці людських ракових захворювань (Dong et al (2002) *Nat. Med* 8:787-9). Взаємодія між PD-1 та PD-L1 призводить до зменшення кількості інфільтруючих пухлину лімфоцитів, зменшення проліферації, опосередкованої рецептором Т-клітин, і вислизанню ракових клітин від імунологічного нагляду (Dong et al. (2003) *J. Mol. Med.* 81:281-7; Blank et al. (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi et al. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). Імунодепресія може обернутися інгібуванням місцевої взаємодії PD-1 з PD-L1, і даний ефект є адитивним також при блокуванні взаємодії PD-1 з PD-L2 (Iwai et al. (2002) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99: 12293-7; Brown et al. (2003) *J. Immunol.* 170:1257-66).

PD1 є інгібуючим членом сімейства CD28, що експресується на активованих В-клітинах, Т-клітинах і мієлоїдних клітинах (Agata et al, вище; Okazaki et al. (2002) *Curr Opin Immunol* 14: 391779-82; Bennett et al. (2003) *J Immunol YWJL* 1-8). У PD-1-дефіцитних тварин розвиваються різні аутоімунні фенотипи, що включають аутоімунну кардіоміопатію і вовчакоподібний синдром з артритом і нефритом (Nishimura et al. (1999) *Immunity* 10: 141-51; Nishimura et al. (2001) *Science* 291:319-22). Додатково виявили те, що PD1 відіграє роль в аутоімунному енцефаломієліті, системному червоному вовчаку, захворюванні "трансплантат проти хазяїна" (GVHD), діабеті типу I і ревматоїдному артриті (Salama et al. (2003) *J Exp Med* 198:71-78; Prokunina and Alarcon-Riquelme (2004) *Hum Mol Genet* 13\_:R143; Nielsen et al. (2004) *Lupus* 11:510). В лінії мишиної В-клітинної пухлини було показано те, що ITSM PD1 є суттєвим для блокування опосередкованого BCR (В-клітинний рецептор) потоку  $Ca^{2+}$  і фосфорилювання тирозину наступних ефекторних молекул (Okazaki et al. (2001) *PNAS* 98: 13866-71).

В різних патентних заявках розкриті продукція антитіл до PD-1 і/або способи посилення імунних відповідей з використанням агента (що включає антитіло до PD-1), який перешкоджає зв'язуванню з PD-L1 і/або сигналізації PD-1, включаючи наступні: US2003/0039653, US2004/0213795, US2006/0110383, US2007/0065427, US2007/0122378, US2012/237522, WO2004/072286, WO2006/121168, WO2006/133396, WO2007/005874, WO2008/083174, WO2008/156712, WO2009/024531, WO2009/014708, WO2009/114335, WO2010/027828, WO2010/027423, WO2010/036959, WO2010/029435, WO2010/029434, WO2010/063011, WO2010/089411, WO2011/066342, WO2011/110604, WO2011/110621 та WO2012/145493.

#### КОРОТКИЙ ВИКЛАД СУТІ ВИНАХОДУ

Згідно з даним винаходом запропоновані антитіла до PD1 та способи їх застосування.

Одним аспектом даного винаходу є таке антитіло до PD1, де дане антитіло:

i) конкурує за зв'язування з PD-1 з антитілом до PD1, яке містить VH і VL PD1-0103, і/або

ii) зв'язується з PD-1 людини і яванського макака; і/або

iii) посилює секрецію інтерферону-гамма (IFN-гамма) алогенними стимульованими Т-клітинами на 85 % або більше при концентрації антитіла 10 мкг/мл; і/або

iv) посилює секрецію фактора некрозу пухлин альфа (TNF альфа) алогенними стимульованими Т-клітинами на 200 % або більше при концентрації антитіла 10 мкг/мл.

Іншим аспектом винаходу є антитіло, яке зв'язується з людським PD1, де дане антитіло посилює секрецію інтерферону-гамма (IFN-гамма) алогенними стимульованими Т-клітинами на 85 % або більше при концентрації антитіла 10 мкг/мл в аналізі реакції змішаної культури лімфоцитів (MLR).

Іншим аспектом винаходу є антитіло, яке зв'язується з людським PD1, де дане антитіло посилює секрецію фактора некрозу пухлин альфа (TNF альфа) алогенними стимульованими Т-клітинами на 200 % або більше при концентрації антитіла 10 мкг/мл в аналізі реакції змішаної культури лімфоцитів (MLR).

Згідно з даним винаходом запропоноване виділене антитіло, яке зв'язується з людським PD1, де дане антитіло містить:

А) (а) HVR-H1 (гіперваріабельна ділянка 1 важкого ланцюга), яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1; (б) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2; (в) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3; (г) HVR-L1 (гіперваріабельна ділянка 1 легкого ланцюга), яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4; (д) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5; і (е) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6; або

Б) (а) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:9; (б) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10; (в) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11; (г) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12; (д) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13; і (е) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14; або



HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:44, (ii) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:45, і (iii) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:46; або

Ж) (а) домен VH, який містить (i) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:49, (ii) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:50, і (iii) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:51, і (б) домен VL, який містить (i) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:52, (ii) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:53, і (iii) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:54.

Згідно з даним винаходом додатково запропоноване виділене антитіло, яке зв'язується з людським PD1, де дане антитіло

А)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:7 і послідовність VL SEQ ID NO:8;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

або Б)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:58;

ii) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:59;

iii) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:60;

iv) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:61.

або В)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:15 і послідовність VL SEQ ID NO:16;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

або Г)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:23 і послідовність VL SEQ ID NO:24;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

або Д)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:31 і послідовність VL SEQ ID NO:32;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

або Е)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:39 і послідовність VL SEQ ID NO:40;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

або Ж)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:47 і послідовність VL SEQ ID NO:48;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

або З)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:55 і послідовність VL SEQ ID NO:56;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

В одному втіленні антитіло до PD1 згідно з винаходом являє собою моноклональне антитіло.

В одному втіленні антитіло до PD1 згідно з винаходом являє собою людське, гуманізоване або химерне антитіло.

В одному втіленні антитіло до PD1 згідно з винаходом являє собою фрагмент антитіла, який зв'язується з PD1.

В одному втіленні антитіло до PD1 згідно з винаходом являє собою фрагмент Fab.

Згідно з винаходом запропонована виділена нуклеїнова кислота, кодує антитіло згідно з будь-яким з попередніх пунктів.

Згідно з винаходом запропонована клітина-хазяїн, яка містить таку нуклеїнову кислоту.

Згідно з винаходом запропонований спосіб продукування антитіла, що включає культивування клітини-хазяїна таким чином, що продукується антитіло.

Згідно з винаходом запропонований такий спосіб продукування антитіла, що додатково включає виділення антитіла з клітини-хазяїна.

Згідно з винаходом запропонований фармацевтичний препарат, який містить антитіло, описане в даному документі, і фармацевтично прийнятний носій.

Згідно з винаходом запропоноване антитіло, описане в даному документі, для застосування як лікарський засіб.

Згідно з винаходом запропоноване антитіло, описане в даному документі, для застосування в лікуванні раку.

Згідно з винаходом запропоноване застосування антитіла, описаного в даному документі, в приготуванні лікарського засобу. В одному втіленні даний лікарський засіб призначений для лікування раку.

Згідно з винаходом запропонований спосіб лікування індивіда, який має рак, що включає введення даному індивіду ефективної кількості антитіла, описаного в даному документі.

#### КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Фіг. 1: блокада PD1 химерним PD1-0103 сильно збільшує секрецію IFN-гамма алогенними стимульованими первинними людськими Т-клітинами.

Фіг. 2: блокада PD1 химерним PD1-0103 сильно збільшує секрецію інтерферону-гамма (IFN- $\gamma$ ) алогенними стимульованими первинними людськими Т-клітинами.

Фіг. 3: блокада PD1 химерним PD1-0103 сильно збільшує секрецію фактора некрозу пухлин альфа (TNF) алогенними стимульованими первинними людськими Т-клітинами.

Фіг. 4: 4А) частота Т-клітин CD4, що продукують гранзим Б, і 4Б) кількість IFN- $\gamma$ , виявлена за поглинанням (оптичною щільністю, О.Щ.), в супернатанті MLR у присутності зростаючих концентрацій різних антитіл до PD-1.

Фіг. 5: 5А) вплив блокади PD1/PD-L1 на реактивацію приглушеної сигналізації Т-клітинного рецептора у присутності різних антитіл до PD-1; 5Б) вплив блокади PD1/PD-L1 на реактивацію приглушеної сигналізації Т-клітинного рецептора у присутності різних антитіл до PD-1.

Фіг. 6: структура PD1-ECD в комплексі з Fab PD1-0103.

Фіг. 7: структура комплексу PD1-ECD з Fab PD1-0103: глікозилювання на Asn58 на PD1 бере участь у взаємодії.

Фіг. 8: структура комплексу PD1-ECD з Fab PD1-0103: вигляд на епітоп/паратоп.

Фіг. 9: контакти центрального бокового цукрового ланцюга на Asn58 PD1 - важкого ланцюга Fab PD1-0103: контакти, ідентифіковані за граничною відстанню 5Å.

Фіг. 10: залишки PD1-ECD, які взаємодіють з антитілом - вигляд послідовності з детальними властивостями контактів - PD-1.

Фіг. 11: залишки антитіла, які взаємодіють з PD1-ECD - вигляд послідовності з детальними властивостями контактів - важкий ланцюг.

Фіг. 12: залишки антитіла, які взаємодіють з PD1-ECD - вигляд послідовності з детальними властивостями контактів - легкий ланцюг.

Фіг. 13А: зв'язування різних антитіл з PD1, неглікозилюваним на Asn58 (зліва), і з PD1, глікозилюваним на Asn58 (праворуч) (сенсограми Biacore).

Фіг. 13Б: зв'язування різних антитіл з PD1, неглікозилюваним на Asn58, і з PD1, глікозилюваним на Asn58 - швидкість асоціації - дисоціації Mab, визначена Biacore.

Фіг. 14А: інгібування росту пухлини in vivo PD1-0103-0312 (aPD-1) у порівнянні з ніволумабом в комбінації з біспецифічним антитілом CEA-CD3 - при високих дозах.

Фіг. 14Б: інгібування росту пухлини in vivo PD1-0103-0312 (aPD-1) у порівнянні з ніволумабом в комбінації з біспецифічним антитілом CEA-CD3 - при високих дозах.

#### ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВТІЛЕНЬ ВИНАХОДУ

Термін "акцепторна людська каркасна ділянка" для цілей даного документа являє собою каркасну ділянку, яка містить амінокислотну послідовність каркасної ділянки варіабельного домену легкого ланцюга (VL) або каркасної ділянки варіабельного домену важкого ланцюга (VH), що походить з каркасної ділянки людського імуноглобуліну або людської консенсусної каркасної ділянки, як визначено нижче. Акцепторна людська каркасна ділянка, "що походить з" каркасної ділянки людського імуноглобуліну або людської консенсусної каркасної ділянки, може містити таку саму амінокислотну послідовність, як і вони, або вона може містити зміни амінокислотної послідовності. У деяких втіленнях кількість змін амінокислот становить 10 або менше, 9 або менше, 8 або менше, 7 або менше, 6 або менше, 5 або менше, 4 або менше, 3 або менше, або 2 або менше. У деяких втіленнях акцепторна людська каркасна ділянка VL є ідентичною за послідовністю каркасної ділянки VL людського імуноглобуліну або послідовністю людської консенсусної каркасної ділянки.

Термін "PD1", "людський PD1", "PD-1" або "людський PD-1" при використанні в даному документі належить до людського білка PD1 (SEQ ID NO: 68) (білок без сигнальної послідовності) / (SEQ ID NO: 70) (білок із сигнальною послідовністю). Фраза антитіло "яке зв'язується з людським PD1", "яке специфічно зв'язується з людським PD1", "яке зв'язується з людським PD1" або "антитіло до PD1" в тому вигляді, в якому вона використовується в даному документі, належить до антитіла, яке специфічно зв'язується з людським антигеном PD1 або його позаклітинним доменом (ECD) з афінністю зв'язування із значенням  $K_D$   $1,0 \times 10^{-8}$  моль/л або менше, в одному втіленні - із значенням  $K_D$   $1,0 \times 10^{-9}$  моль/л або менше, в одному втіленні - із значенням  $K_D$  від  $1,0 \times 10^{-9}$  моль/л до  $1,0 \times 10^{-13}$  моль/л. Афінність зв'язування визначається стандартним аналізом зв'язування, таким як методика поверхневого плазмонного резонансу (Biacore®, GE-Healthcare, Упсала, Швеція), наприклад, з використанням позаклітинного домену PD1.

Людський PD1 має сайти N-зв'язаного глікозилювання на залишках PD-1 49, 58, 74 SEQ ID NO: 70 (див., наприклад, D.Y. Lin et al, PNAS 105 (2008) 3011-3016)). Дерево центрального цукрового ланцюга (N-зв'язаного глікозилювання) в положенні Asn58 PD-1 має наступну структуру відносно моносахаридів. В одному втіленні центральний цукровий ланцюг на Asn58 PD1 належить до перших 5 цукрів (моносахаридів), які приєднуються до PD1 на Asn58.

Asn58-N-GlcNAc(FUC) - GlcNAc- - BMA - MAN (див. Фіг. 9), де використовуються наступні скорочення.

[GlcNAc] - NGA - N-ацетил-бета-D-галактозамін - 2-(ацетиламіно)-2-дезоксид-бета-D-галактопіраноза

[FUC] - альфа-L-фукоза

[BMA] - бета-D-манопіраноза

[MAN] - альфа-D-манопіраноза

Перший GlcNAc в цукровому ланцюзі є фукозилізованим, що скорочується як GlcNAc(FUC).

В одному втіленні центральний цукровий ланцюг на Asn58 PD1 належить до перших 5 цукрів (моносахаридів) GlcNAc, FUC, GlcNAc, BMA, MAN, які приєднуються до PD1 на Asn58.

Термін "антитіло" використовується в даному документі в найширшому значенні та охоплює різні структури антитіл, включаючи моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) і фрагменти антитіл, але не обмежуючись ними, за умови, що вони демонструють бажану активність зв'язування антигену.

Термін "фрагмент антитіла" належить до молекули, відмінної від інтактного антитіла, яка містить частину інтактного антитіла, яка зв'язується з антигеном, з яким зв'язується інтактне антитіло. Приклади фрагментів антитіла включають Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; діатіла; лінійні антитіла; одноланцюжкові молекули антитіл (наприклад, scFv) і мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл, але не обмежуються ними.

Фраза "антитіло, яке зв'язується з тим самим епітопом", що і контрольне антитіло, належить до антитіла, яке блокує зв'язування контрольного антитіла з його антигеном в конкурентному аналізі на 50 % або більше, або, навпаки, контрольне антитіло блокує зв'язування антитіла з його антигеном в конкурентному аналізі на 50 % або більше. В даному документі виробляється типовий конкурентний аналіз.

Термін "химерне" антитіло належить до антитіла, в якому частину важкого і/або легкого ланцюга походить з конкретного джерела або виду, тоді як решта важкого і/або легкого ланцюга походить з іншого джерела або виду.

"Клас" антитіла належить до типу константного домену або константної ділянки, які має його важкий ланцюг. Існує п'ять головних класів антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, і декілька з них можуть додатково поділятися на підкласи (ізотипи), наприклад, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> і IgA<sub>2</sub>. Константні домени важкого ланцюга, які відповідають різним класам імуноглобулінів, називаються α, δ, ε, γ і μ відповідно.

Термін "цитотоксичний агент" в тому вигляді, в якому він використовується в даному документі, належить до речовини, яка інгібує або попереджає клітинні функції і/або викликає загибель або руйнування клітини. Цитотоксичні агенти включають радіоактивні ізотопи (наприклад, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> і радіоактивні ізотопи Lu); хіміотерапевтичні агенти або лікарські засоби (наприклад, метотрексат, адриаміцин, алкалоїди барвінку (вінкристин, вінбластин, етопозид), доксорубіцин, мелфалан, мітоміцин C, хлорамбуцил, даунорубіцин або інші інтеркалюючі агенти); агенти, що інгібують ріст; ферменти та їх фрагменти, такі як нуклеолітичні ферменти; антибіотики; токсини, такі як низькомолекулярні токсини або ферментативно активні токсини бактеріального, грибного, рослинного або тваринного походження, включаючи їх фрагменти і/або варіанти; і різні протипухлинні або протиракові агенти, розкриті нижче, але не обмежуються ними.

"Ефективна кількість" агента, наприклад, фармацевтичного препарату, належить до ефективної кількості в необхідних дозуваннях і протягом необхідних періодів часу для досягнення бажаного терапевтичного або профілактичного результату.

Термін "ділянка Fc" використовується в даному документі для визначення C-кінцевої ділянки важкого ланцюга імуноглобуліну, яка містить щонайменше частину константної ділянки. Даний термін включає ділянки Fc з природною послідовністю та варіанти ділянки Fc. В одному втіленні ділянка Fc важкого ланцюга людського IgG простягається від Cys226 або від Pro230 до карбоксильного кінця важкого ланцюга. Однак C-кінцевий лізин (Lys447) ділянки Fc може бути присутнім або може бути відсутнім. Якщо в даному документі не визначено інше, нумерація амінокислотних залишків у ділянці Fc або в константній ділянці здійснюється згідно із системою нумерації EU, яка також називається індекс EU, як описано в Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health,



Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.

"Каркасна ділянка" або "FR" належить до залишків варіабельного домену, відмінних від залишків гіперваріабельної ділянки (HVR). FR варіабельного домену звичайно складається з чотирьох FR доменів: FR1, FR2, FR3 і FR4. Відповідно, послідовності HVR і FR звичайно з'являються в VH (або VL) в наступній послідовності: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Терміни "повнорозмірне антитіло", "інтактне антитіло" і "повне антитіло" використовуються в даному документі взаємозамінно для назви антитіла, яке має по суті аналогічну структуру структурі природного антитіла, або яке має важкі ланцюги, які містять ділянку Fc, як визначено в даному документі.

Терміни "клітина-хазяїн", "лінія клітин-хазяїв" і "культура клітин-хазяїв" використовуються взаємозамінно і належить до клітин, в які була введена екзогенна нуклеїнова кислота, включаючи потомство таких клітин. Клітини-хазяї включають "трансформантів" і "трансформовані клітини", які включають первинні трансформовані клітини і потомство, одержане від них, незалежно від кількості пасажів. Потомство може не бути повністю ідентичним батьківській клітині за вмістом нуклеїнових кислот, але може містити мутації. Сюди включене мутантне потомство, яке має таку саму функцію або біологічну активність, на яку здійснюється скринінг або відбір у початково трансформованої клітини.

"Людське антитіло" являє собою антитіло, яке має амінокислотну послідовність, яка відповідає амінокислотній послідовності антитіла, що продукується людиною або людською клітиною, або походить з джерела, що не є людським, в якому використовується людський репертуар антитіл або інших послідовностей, кодуючих людські антитіла. Дане визначення людського антитіла конкретно виключає гуманізоване антитіло, що містить антигензв'язуючі залишки, які не є людськими.

"Людська консенсусна каркасна ділянка" являє собою каркасну ділянку, яка являє собою амінокислотні залишки, що частіше за все зустрічаються, в наборі послідовностей каркасних ділянок VL або VH людського імуноглобуліну. В загальному, набір послідовностей VL або VH людського імуноглобуліну походить з підгрупи послідовностей варіабельного домену. Звичайно дана підгрупа послідовностей являє собою таку саму підгрупу, що і в Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3. В одному втіленні для VL даною підгрупою є підгрупа каппа I, така сама, як і в Kabat et al., вище. В одному втіленні для VH даною підгрупою є підгрупа III, така сама, як і в Kabat et al., вище.

Термін "гуманізоване" антитіло належить до химерного антитіла, що містить амінокислотні залишки з HVR, що не є людськими, і амінокислотні залишки з людських FR. У деяких втіленнях гуманізоване антитіло буде містити по суті всі з щонайменше одного і типово двох варіабельних доменів, в яких всі або по суті всі з HVR (наприклад, CDR (ділянка, яка визначає комплементарність)) відповідають HVR антитіла, що не є людським, і всі або по суті всі FR відповідають FR людського антитіла. Гуманізоване антитіло можливо може містити щонайменше частину константної ділянки антитіла, що походить з людського антитіла. Термін "гуманізована форма" антитіла, наприклад, антитіла, що не є людським, належить до антитіла, яке піддавалося гуманізації.

Термін "гіперваріабельна ділянка" або "HVR" в тому вигляді, в якому він використовується в даному документі, належить до кожної з ділянок варіабельного домену антитіла, які є гіперваріабельними за послідовністю ("ділянки, що визначають комплементарність" або "CDR") і/або утворюють структурно визначені петлі ("гіперваріабельні петлі"), і/або містять залишки, контактуючі з антигеном ("контакти з антигеном"). В загальному, антитіла містять шість HVR: три в VH (H1, H2, H3) і три в VL (L1, L2, L3). Типові HVR в даному документі включають:

(а) гіперваріабельні петлі, що знаходяться в амінокислотних залишках 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) і 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));

(б) CDR, що знаходяться в амінокислотних залишках 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) і 95-102 (H3) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(в) контакти з антигеном, що знаходяться в амінокислотних залишках 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) і 93-101 (H3) (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); і

(г) комбінації (а), (б) і/або (в), що включають амінокислотні залишки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) і 94-102 (H3).

Якщо не вказано інше, залишки HVR та інші залишки у варіабельному домені (наприклад, залишки FR) нумеруються в даному документі згідно з Kabat et al., вище.

"Імунокон'югат" являє собою антитіло, кон'юговане з одною або більше ніж одною

гетерологічною молекулою, що включає цитотоксичний агент, але що не обмежується ним.

"Індивід" або "суб'єкт" являє собою ссавця. Ссавці включають домашніх тварин (наприклад, корів, овець, кішок, собак і коней), приматів (наприклад, людину і приматів, що не є людиною, таких як мавпи), кроликів і гризунів (наприклад, мишей і щурів), але не обмежуються ними. У деяких втіленнях індивід або суб'єкт являє собою людину.

"Виділене" антитіло являє собою антитіло, яке було відділене від компонента його природного оточення. У деяких втіленнях антитіло очищують до чистоти, більшої, ніж 95 % або 99 % при визначенні, наприклад, електрофоретичними (наприклад, SDS-PAGE (електрофорез в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію), ізоелектрофокусування (IEF), капілярний електрофорез) або хроматографічними (наприклад, іонообмінна ВЕРХ (високоєфективна рідинна хроматографія) або ВЕРХ з оберненою фазою) способами. Відносно огляду способів оцінки чистоти антитіл, див., наприклад, Flatman, S. et al., J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87.

Термін "виділена" нуклеїнова кислота належить до молекули нуклеїнової кислоти, яка була відділена від компонента її природного оточення. Виділена нуклеїнова кислота включає молекулу нуклеїнової кислоти, яка міститься в клітинах, які звичайно містять дану молекулу нуклеїнової кислоти, але дана молекула нуклеїнової кислоти присутня позахромосомно або в ділянці хромосоми, яка відрізняється від її природної хромосомної ділянки.

Фраза "виділена нуклеїнова кислота, кодує антитіло до PD1" належить до одної або більше ніж одної молекули нуклеїнової кислоти, кодує важкий і легкий ланцюг антитіла (або їх фрагменти), включаючи таку(кі) молекулу(ли) нуклеїнової кислоти в одному векторі або окремих векторах, і таку(кі) молекулу(ли) нуклеїнової кислоти, що присутні в одному або більше ніж одному положенні в клітині-хазяїні.

Термін "моноклональне антитіло" в тому вигляді, в якому він використовується в даному документі, належить до антитіла, одержаного з популяції по суті гомогенних антитіл, тобто індивідуальні антитіла, що становлять популяцію, є ідентичними і/або зв'язуються з тим самим епітопом, за виключенням можливих варіантів антитіл, наприклад, які містять мутації, що зустрічаються в природі або які виникають під час одержання препарату моноклонального антитіла, причому такі варіанти звичайно присутні в мінорних кількостях. На відміну від препаратів поліклональних антитіл, які типово включають різні антитіла, направлені проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло препарату моноклональних антитіл направлено проти однієї детермінанти на антигені. Таким чином, модифікатор "моноклональний" вказує на характер антитіла як одержаного з по суті гомогенної популяції антитіл, і його не потрібно тлумачити як такий, що вимагає продукції антитіла будь-яким конкретним способом. Наприклад, моноклональні антитіла, що підлягають застосуванню згідно з даним винаходом, можна одержувати цілою низкою методик, які включають спосіб гібридоми, способи генної інженерії, способи фагового дисплея і способи з використанням трансгенних тварин, які містять всі локуси людського імуноглобуліну або їх частину, але які не обмежуються ними, причому такі способи та інші типові способи для одержання моноклональних антитіл описуються в даному документі.

Термін "голе антитіло" належить до антитіла, яке не кон'юговане з гетерологічним групуванням (наприклад, цитотоксичним групуванням) або радіоактивною міткою. Голе антитіло може бути присутнім у фармацевтичному препараті.

Термін "природні антитіла" належить до молекул імуноглобулінів, що зустрічаються в природі, з варіюючими структурами. Наприклад, природні антитіла IgG являють собою гетеротетрамерні глікопротеїни з молекулярною масою приблизно 150000 Дальтон, які складаються з двох ідентичних легких ланцюгів і двох ідентичних важких ланцюгів, які зв'язані дисульфідними зв'язками. Від N- до C-кінця кожний важкий ланцюг має варіабельну ділянку (VH), яка також називається варіабельний важкий домен або варіабельний домен важкого ланцюга, з наступними трьома константними доменами (CH1, CH2 і CH3). Аналогічним чином, від N- до C-кінця кожний легкий ланцюг має варіабельну ділянку (VL), яка також називається варіабельний легкий домен або варіабельний домен легкого ланцюга, з наступним константним легким доменом (CL). Легкий ланцюг антитіла може бути приписаний до одного з двох типів, що називаються каппа ( $\kappa$ ) і лямбда ( $\lambda$ ), на основі амінокислотної послідовності її константного домену.

Термін "аркуш-вкладка в упаковці" використовується для назви інструкцій, які традиційно включаються в наявні в продажу упаковки терапевтичних продуктів, які містять інформацію про показання, застосування, дозування, введення, комбіновану терапію, протипоказання і/або попередження, що стосуються застосування таких терапевтичних продуктів.

"Відсоток (%) ідентичності амінокислотної послідовності" по відношенню до контрольної послідовності поліпептиду визначається як відсоткова частка амінокислотних залишків у

послідовності-кандидати, які є ідентичними амінокислотним залишкам в контрольній послідовності поліпептиду, після вирівнювання даних послідовностей і, якщо необхідно, введення пропусків для досягнення максимального відсотка ідентичності послідовності, і не розглядаючи будь-які консервативні заміни як частину ідентичності послідовності. Вирівнювання для цілей визначення відсотка ідентичності амінокислотної послідовності може досягатися різними способами, які знаходяться в межах кваліфікації в даній галузі, наприклад, з використанням загальнодоступних комп'ютерних програм, таких як програми BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Фахівці в даній галузі можуть визначати придатні параметри для вирівнювання послідовностей, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання за всією довжиною порівнюваних послідовностей. Для цілей даного документа, однак, значення % ідентичності амінокислотної послідовності одержуються з використанням комп'ютерної програми порівняння послідовностей ALIGN-2. Авторство комп'ютерної програми порівняння послідовностей ALIGN-2 належить Genentech, Inc., і вихідний код з користувацькою документацією був поданий в Бюро реєстрації авторських прав США, Washington D.C., 20559, де він зареєстрований під реєстраційним № авторського права США TXU510087. Програма ALIGN-2 є загальнодоступною від Genentech, Inc., Південний Сан-Франциско, Каліфорнія, або може бути складена з вихідного коду. Програму ALIGN-2 потрібно складати для застосування в операційній системі UNIX, включаючи цифрову UNIX V4.0D. Всі параметри порівняння послідовностей встановлюються програмою ALIGN-2 і не варіюють.

У ситуаціях, коли ALIGN-2 застосовується для порівнянь амінокислотних послідовностей, % ідентичності амінокислотної послідовності даної амінокислотної послідовності А з або відносно даної амінокислотної послідовності Б (що може бути альтернативно сформульовано як дана амінокислотна послідовність А, яка має або містить визначений % ідентичності амінокислотної послідовності з або відносно даної амінокислотної послідовності Б) розраховується наступним чином:

100 помножити на частку  $X/Y$

де Х являє собою кількість амінокислотних залишків, підрахованих як ідентичні співпадиння, за допомогою програми вирівнювання послідовностей ALIGN-2 у вирівнюванні А і Б даною програмою, і де Y являє собою загальну кількість амінокислотних залишків у Б. Буде зрозуміло те, що коли довжина амінокислотної послідовності А не дорівнює довжині амінокислотної послідовності Б, % ідентичності амінокислотної послідовності А з Б не буде дорівнювати % ідентичності амінокислотної послідовності Б з А. Якщо конкретно не стверджується інше, всі значення % ідентичності амінокислотної послідовності, що використовуються в даному документі, як описано в безпосередньо попередньому абзаці, одержані з використанням комп'ютерної програми ALIGN-2.

Термін "фармацевтичний препарат" належить до препарату, який знаходиться в такій формі, щоб забезпечувати ефективну біологічну активність активного інгредієнта, що міститься в ньому, і який не містить додаткових компонентів, які є неприйнятно токсичними для суб'єкта, якому вводився б препарат.

Термін "фармацевтично прийнятний носій" належить до інгредієнта в фармацевтичному препараті, відмінному від активного інгредієнта, який є нетоксичним для суб'єкта. Фармацевтично прийнятний носій включає буфер, ексципієнт, стабілізатор або консервант, але не обмежується ними.

Термін "лікування" (і його граматичні варіації, такі як "лікувати" або "здійснення лікування") в тому вигляді, в якому він використовується в даному документі, належить до клінічного втручання у спробі змінити природний хід захворювання індивіда, якого лікують, і воно може здійснюватися або для профілактики, або протягом клінічної патології. Бажані ефекти лікування включають попередження появи або рецидиву захворювання, полегшення симптомів, зменшення будь-яких прямих або опосередкованих патологічних наслідків захворювання, попередження метастазів, зменшення швидкості прогресування захворювання, зменшення інтенсивності або тимчасове послаблення хворобливого стану і ремісію або покращений прогноз, але не обмежуються ними. У деяких втіленнях антитіла за винаходом використовуються для затримки розвитку захворювання або для уповільнення прогресування захворювання.

Термін "варіабельна ділянка" або "варіабельний домен" належить до домену важкого або легкого ланцюга антитіла, який бере участь у зв'язуванні антитіла з антигеном. Варіабельні домени важкого ланцюга і легкого ланцюга (VH і VL відповідно) природного антитіла звичайно мають аналогічні структури, причому кожний домен містить чотири консервативні каркасні ділянки (FR) і три гіперваріабельні ділянки (HVR). (див., наприклад, Kindt, T.J., et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), сторінка 91). Один домен VH або VL

може бути достатнім для надання специфічності зв'язування з антигеном. Крім того, антитіла, які зв'язуються з конкретним антигеном, можуть бути виділені з використанням домену VH або VL з антитіла, яке зв'язується з антигеном, для скринінгу бібліотеки комплементарних доменів VL або VH відповідно. Див., наприклад, Portolano, S. et al., J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. et al., Nature 352 (1991) 624-628).

Термін "вектор" в тому вигляді, в якому він використовується в даному документі, належить до молекули нуклеїнової кислоти, здатної розмножувати іншу нуклеїнову кислоту, з якою він зв'язаний. Даний термін включає вектор як структуру нуклеїнової кислоти, що самореplikується, а також вектор, включений в геном клітини-хазяїна, в яку він був введений. Визначені вектори здатні керувати експресією нуклеїнових кислот, з якими вони зв'язані функціональним чином. Такі вектори називаються в даному документі "експресійними векторами".

#### I. КОМПОЗИЦІЇ ТА СПОСОБИ

В одному аспекті даний винахід частково оснований на даних про те, що вибрані антитіла до PD1 за винаходом зв'язуються з визначеними епітопами PD1 і мають здатність збільшувати активацію різних імунних клітин (наприклад, Т-клітин, В-клітин, клітин NK (натуральний кілер), дендритних клітин (DC), моноцитів і макрофагів). Наприклад, вони збільшують вивільнення (секрецію) імуномодуючих цитокінів (наприклад, інтерферону-гамма і гранзиму В). Іншими імуномодуючими цитокінами, рівень яких збільшується або може бути збільшений, є, наприклад, секреція фактора некрозу пухлин альфа (TNF альфа) і IL-12 (інтерлейкін-12). Терміни секреція інтерферону-гамма (IFN-гамма), фактора некрозу пухлин альфа (TNF альфа), IL-12 тощо. У тому вигляді, в якому вони використовуються в даному документі, належать до людських цитокінів.

У деяких втіленнях запропоновані антитіла, які зв'язуються з PD1. Антитіла за винаходом є корисними, наприклад, для діагностики або лікування раку.

#### A. Типові антитіла до PD1

В одному аспекті згідно з винаходом запропоновані виділені антитіла, які зв'язуються з людським PD1.

У деяких втіленнях запропоноване антитіло до PD1, де дане антитіло:

i) конкурує за зв'язування з PD-1 з антитілом до PD1, яке містить VH і VL PD1-0103, і

ii) зв'язується з PD-1 людини і яванського макака; і

iii) посилює секрецію інтерферону-гамма (IFN-гамма) алогенними стимульованими Т-клітинами на 85 % або більше (в одному переважному втіленні на 90 % або більше, в одному переважному втіленні на 95 % або більше) при концентрації антитіла 10 мкг/мл (де секреція без антитіла прийнята за 0 % (базальний рівень IFN-гамма), і секреція з 20 ЕО/мл рекомбінантного людського IL-2 прийнята за 100 % (в аналізі реакції змішаної культури (алогенних) лімфоцитів (MLR) згідно з Прикладом 3); і/або

iv) посилює секрецію фактора некрозу пухлин альфа (TNF альфа) алогенними стимульованими Т-клітинами на 200 % або більше (в одному переважному втіленні на 250 % або більше) при концентрації антитіла 10 мкг/мл (де секреція без антитіла прийнята за 0 % (базальний рівень IFN-гамма), і секреція з 20 ЕО/мл рекомбінантного людського IL-2 прийнята за 100 % (в аналізі реакції змішаної культури (алогенних) лімфоцитів (MLR) згідно з Прикладом 3).

В одному аспекті згідно з винаходом запропоноване антитіло до PD1, що містить (а) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1; (б) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2; (в) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3; (г) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4; (д) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5; і (е) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6.

В іншому аспекті антитіло за винаходом містить (а) домен VH, який містить (i) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1; (ii) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2; і (iii) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:3; і (б) домен VL, який містить (i) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4; (ii) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5; і (iii) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6.

В одному втіленні таке антитіло до PD1 містить

i) послідовність VH SEQ ID NO:7 і послідовність VL SEQ ID NO:8;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

В одному втіленні таке антитіло до PD1 містить

i) послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:58; або

ii) послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:59; або







послідовність SEQ ID NO:54.

В іншому аспекті антитіло за винаходом містить (а) домен VH, який містить (i) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:49; (ii) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:50; і (iii) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:51; і (б) домен VL, який містить (i) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:52; (ii) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:53; і (iii) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:54.

В одному втіленні таке антитіло до PD1 містить

i) послідовність VH SEQ ID NO:47 і послідовність VL SEQ ID NO:48;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i).

В одному переважному втіленні запропоноване антитіло, яке зв'язується з тим самим епітопом, що і антитіло до PD1, що містить послідовність VH SEQ ID NO:7 і послідовність VL SEQ ID NO:8.

В одному переважному втіленні запропоноване антитіло, яке конкурує за зв'язування з людським PD1 з антитілом до PD1, яке містить послідовність VH SEQ ID NO:7 і послідовність VL SEQ ID NO:8 (при визначенні в конкурентному аналізі, описаному в Прикладі 2 (ELISA (твердофазний імуоферментний аналіз) картування епітопів/конкурентний аналіз зв'язування)).

В одному аспекті згідно з винаходом запропоноване антитіло до PD1 (наприклад, антитіло, яке зв'язується з людським PD1), що містить

A) (а) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1; (б) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2; (в) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3; (г) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4; (д) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5; і (е) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6; або

В іншому аспекті згідно з винаходом запропоноване антитіло до PD1 (наприклад, антитіло, яке зв'язується з людським PD1), що містить

(а) домен VH, який містить (i) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1; (ii) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2; і (iii) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:3; і (б) домен VL, який містить (i) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4; (ii) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5; і (iii) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6.

В одному аспекті згідно з винаходом запропоноване антитіло, яке зв'язується з людським PD1, яке

A)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:7 і послідовність VL SEQ ID NO:8;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

або Б)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:58.

ii) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:59.

iii) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:60.

iv) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:61.

або В)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:15 і послідовність VL SEQ ID NO:16;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

або Г)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:23 і послідовність VL SEQ ID NO:24;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

або Д)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:31 і послідовність VL SEQ ID NO:32;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

або Е)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:39 і послідовність VL SEQ ID NO:40;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

або Ж)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:47 і послідовність VL SEQ ID NO:48;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

або З)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:55 і послідовність VL SEQ ID NO:56;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);



В одному аспекті згідно з винаходом запропоноване антитіло, яке зв'язується з людським PD1, яке

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:7 і послідовність VL SEQ ID NO:8;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i).

5 В одному аспекті згідно з винаходом запропоноване антитіло, яке зв'язується з людським PD1, яке містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:58.

В одному аспекті згідно з винаходом запропоноване антитіло, яке зв'язується з людським PD1, яке містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:59.

10 В одному аспекті згідно з винаходом запропоноване антитіло, яке зв'язується з людським PD1, яке містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:60.

В одному аспекті згідно з винаходом запропоноване антитіло, яке зв'язується з людським PD1, яке містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:61.

В іншому аспекті згідно з винаходом запропоноване антитіло до PD1 (наприклад, антитіло, яке зв'язується з людським PD1), що містить

15 А) (а) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1; (б) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2; (в) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3; (г) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4; (д) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5; і (е) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6; або

20 Б) (а) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:9; (б) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10; (в) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11; (г) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12; (д) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13; і (е) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14; або

25 В) (а) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17; (б) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18; (в) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19; (г) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20; (д) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21; і (е) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22; або

30 Г) (а) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:25; (б) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:26; (в) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:27; (г) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:28; (д) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:29; і (е) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:30; або

35 Д) (а) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33; (б) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34; (в) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35; (г) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:36; (д) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37; і (е) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38; або

40 Е) (а) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:41; (б) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:42; (в) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:43; (г) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:44; (д) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:45; і (е) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:46; або

45 Ж) (а) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:49; (б) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:50; (в) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:51; (г) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:52; (д) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:53; і (е) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:54;

50 де дане антитіло характеризується незалежно однією або більше ніж однією з наступних властивостей: антитіло до PD-1

i) конкурує за зв'язування з PD-1 з антитілом до PD-1, яке містить VH і VL PD1-0103, і/або

ii) зв'язується з PD-1 людини і яванського макака; і/або

55 iii) посилює секрецію інтерферону-гамма (IFN-гамма) алогенними стимульованими Т-клітинами на 85 % або більше (в одному переважному втіленні на 90 % або більше, в одному переважному втіленні - на 95 % або більше) при концентрації антитіла 10 мкг/мл (де секреція без антитіла прийнята за 0 % (базальний рівень IFN-гамма), і секреція з 20 ЕУ/мл рекомбінантного людського IL-2 прийнята за 100 % (в аналізі реакції (алогенної) змішаної культури лімфоцитів (MLR) згідно з Прикладом 3); і/або

60 iv) посилює секрецію фактора некрозу пухлин альфа (TNF альфа) алогенними

стимульованими Т-клітинами на 200 % або більше (в одному переважному втіленні на 250 % або більше) при концентрації антитіла 10 мкг/мл (де секреція без антитіла прийнята за 0 % (базальний рівень IFN-гамма), і секреція з 20 ЕУ/мл рекомбінантного людського ІЛ-2 прийнята за 100 % (в аналізі реакції (алогенної) змішаної культури лімфоцитів (MLR) згідно з Прикладом 3).

В іншому аспекті згідно з винаходом запропоноване антитіло до PD1 (наприклад, антитіло, яке зв'язується з людським PD1), що містить

А) (а) домен VH, який містить (i) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1; (ii) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2; і (iii) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:3; і (б) домен VL, який містить (i) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4; (ii) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5; і (iii) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6; або

Б) (а) домен VH, який містить (i) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:9; (ii) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10; і (iii) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:11; і (б) домен VL, який містить (i) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12; (ii) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13; і (iii) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14; або

В) (а) домен VH, який містить (i) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17; (ii) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18; і (iii) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:19; і (б) домен VL, який містить (i) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20; (ii) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21; і (iii) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22; або

Г) (а) домен VH, який містить (i) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:25; (ii) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:26; і (iii) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:27; і (б) домен VL, який містить (i) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:28; (ii) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:29; і (iii) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:30; або

Д) (а) домен VH, який містить (i) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33; (ii) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34; і (iii) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:35; і (б) домен VL, який містить (i) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:36; (ii) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37; і (iii) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38; або

Е) (а) домен VH, який містить (i) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:41; (ii) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:42; і (iii) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:43; і (б) домен VL, який містить (i) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:44; (ii) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:45; і (iii) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:46; або

Ж) (а) домен VH, який містить (i) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:49; (ii) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:50; і (iii) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:51; і (б) домен VL, який містить (i) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:52; (ii) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:53; і (iii) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:54;

де дане антитіло характеризується незалежно однією або більше ніж однією з наступних властивостей: антитіло до PD-1

i) конкурує за зв'язування з PD-1 з антитілом до PD-1, яке містить VH і VL PD1-0103, і/або

ii) зв'язується з PD-1 людини і яванського макака; і/або

iii) посилює секрецію інтерферону-гамма (IFN-гамма) алогенними стимульованими Т-клітинами на 85 % або більше (в одному переважному втіленні на 90 % або більше, в одному переважному втіленні - на 95 % або більше) при концентрації антитіла 10 мкг/мл (де секреція без антитіла прийнята за 0 % (базальний рівень IFN-гамма), і секреція з 20 ЕУ/мл рекомбінантного людського ІЛ-2 прийнята за 100 % (в аналізі реакції (алогенної) змішаної культури лімфоцитів (MLR) згідно з Прикладом 3); і/або

iv) посилює секрецію фактора некрозу пухлин альфа (TNF альфа) алогенними

стимульованими Т-клітинами на 200 % або більше (в одному переважному втіленні на 250 % або більше) при концентрації антитіла 10 мкг/мл (де секреція без антитіла прийнята за 0 % (базальний рівень IFN-гамма), і секреція з 20 EU/мл рекомбінантного людського IL-2 прийнята за 100 % (в аналізі реакції (алогенної) змішаної культури лімфоцитів (MLR) згідно з Прикладом 3).

В іншому аспекті винаходу антитіло до PD1 згідно з будь-яким з наведених вище втілень являє собою моноклональне антитіло, яке включає химерне, гуманізоване або людське антитіло. В одному втіленні антитіло до PD1 являє собою фрагмент антитіла, наприклад, Fv, Fab, Fab', scFv, діатіло або фрагмент F(ab')<sub>2</sub>. В іншому втіленні антитіло являє собою повнорозмірне антитіло, наприклад, інтактне антитіло IgG1 або IgG4, або інший клас або ізотип антитіла, як визначено в даному документі.

В іншому аспекті антитіло до PD1 згідно з будь-яким з наведених вище втілень може включати будь-які з характеристик, поодинокі або в комбінації, як описано в Розділах 1-7 нижче:

#### 1. Афіність антитіла

У деяких втіленнях антитіло, запропоноване в даному документі, має константу дисоціації KD, меншу або рівну 1 мкМ, меншу або рівну 100 нМ, меншу або рівну 10 нМ, меншу або рівну 1 нМ, меншу або рівну 0,1 нМ, меншу або рівну 0,01 нМ або меншу або рівну 0,001 нМ (наприклад, 10<sup>-8</sup> М або менше, наприклад, від 10<sup>-8</sup> М до 10<sup>-13</sup> М, наприклад, від 10<sup>-9</sup> М до 10<sup>-13</sup> М).

В одному переважному втіленні KD вимірюється з використанням аналізів поверхневого плазмонного резонансу з використанням BIACORE® при 25 °C з чипами CM5 з іммобілізованим антигеном при ~10 одиницях відповіді (RU). Стисло, біосенсорні чипи на основі карбоксиметильованого декстрана (CM5, BIACORE, Inc.) активуються N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)-карбодііміду гідрохлоридом (EDC) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) згідно з інструкціями постачальника. Антиген розводиться 10 mM ацетатом натрію, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед ін'єкцією при швидкості потоку 5 мкл/хвилину для досягнення приблизно 10 одиниць відповіді (RU) зв'язаного білка. Після ін'єкції антигену ін'єктуються 1 М етаноламін для блокування груп, що не прореагували. Для вимірювань кінетики ін'єктуються двократні серійні розведення Fab (от 0,78 нМ до 500 нМ) в PBS (фосфатно-сольовий буферний розчин) з 0,05 % поверхнево-активної речовини полісорбат 20 (TWEEN-20™) (PBST) при 25 °C при швидкості потоку приблизно 25 мкл/хв. Швидкості асоціації (k<sub>on</sub> або k<sub>a</sub>) і швидкості дисоціації (k<sub>off</sub> або k<sub>d</sub>) розраховуються з використанням простої моделі зв'язування один до одного Лангмюра (BIACORE® Evaluation Software, версія 3.2) за допомогою одночасної апроксимації сенсограм асоціації та дисоціації. Рівноважна константа дисоціації KD розраховується як відношення k<sub>d</sub>/k<sub>a</sub> (k<sub>off</sub>/k<sub>on</sub>). Див., наприклад, Chen, Y. et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881. Якщо швидкість асоціації перевищує 10<sup>6</sup> М<sup>-1</sup> с<sup>-1</sup> при вимірюванні за допомогою описаного вище аналізу поверхневого плазмонного резонансу, тоді швидкість асоціації можна визначати з використанням методики гасіння флуоресценції, в якій вимірюється збільшення або зменшення інтенсивності випускання флуоресценції (збудження - 295 нм; випускання - 340 нм, смуга пропускання - 16 нм) 20 нМ антитіла проти антигену (у вигляді Fab) при 25 °C в PBS, pH 7,2, у присутності зростаючих концентрацій антигену при вимірюванні в спектрометрі, такому як спектрофотометр, оснащений зупиненим струменем (Aviv Instruments), або спектрофотометр серії 8000 SLM-AMINCO™ (ThermoSpectronic) з кюветою з перемішуванням.

#### 2. Фрагменти антитіл

У деяких втіленнях антитіло, запропоноване в даному документі, являє собою фрагмент антитіла. Фрагменти антитіла включають фрагменти Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv і scFv, та інші фрагменти, описані нижче, але не обмежуються ними. Для огляду визначених фрагментів антитіла, див. Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134. Для огляду фрагментів scFv див., наприклад, Plueckthun, A., In: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), pp. 269-315; див. також WO 93/16185; і патенти США № 5571894 і 5587458. Для обговорення фрагментів Fab і F(ab')<sub>2</sub>, які містять залишки епітопа, що зв'язується рецептором утилізації, і мають підвищені періоди напівведення in vivo, див. патент США № 5869046.

Діатіла являють собою фрагменти антитіл з двома антигензв'язуючими сайтами, які можуть бути двохвалентними або біспецифічними. Див., наприклад, EP 0 404 097; WO 1993/01161; Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134 і Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448. Триатіла і тетратіла також описуються в Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134).

Однодоменні антитіла являють собою фрагменти антитіл, які містять весь варіабельний

домен важкого ланцюга антитіла або його частину, або весь варіабельний домен легкого ланцюга антитіла або його частину. У деяких втіленнях однодоменне антитіло являє собою людське однодоменне антитіло (Domantis, Inc., Waltham, MA; див., наприклад, патент США № 6248516 B1).

5 Фрагменти антитіла можуть бути одержані різними методиками, що включають протеолітичне розщеплення інтактного антитіла, а також продукцію рекомбінантними клітинами-хазяями (наприклад, *E. coli* або фагом), але не обмежуються ними, як описано в даному документі.

### 3. Химерні і гуманізовані антитіла

10 У деяких втіленнях антитіло, запропоноване в даному документі, являє собою химерне антитіло. Визначені химерні антитіла описуються, наприклад, в патенті США № 4816567; і Morrison, S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855). В одному прикладі химерне антитіло містить варіабельну ділянку, що не є людською (наприклад, варіабельну ділянку, що походить від миші, щура, хом'яка, кролика або примата, що не є людиною, такого як мавпа), і

15 людську константну ділянку. В іншому втіленні химерне антитіло являє собою антитіло "з перемиканням класу", у якого клас або підклас був змінений від класу або підкласу батьківського антитіла. Химерні антитіла включають їх антигензв'язуючі фрагменти.

У деяких втіленнях химерне антитіло являє собою гуманізоване антитіло. Типово антитіло, що не є людським, гуманізують для зменшення імуногенності у людини при збереженні

20 специфічності та афінності батьківського антитіла, що не є людським. В загальному, гуманізоване антитіло містить один або більше ніж один варіабельний домен, в якому HVR, наприклад, CDR (або їх частини) походять з антитіла, що не є людським, і FR (або їх частини) походять з послідовностей людського антитіла. Гуманізоване антитіло можливо також буде містити щонайменше частину людської константної ділянки. У деяких втіленнях деякі залишки

25 FR в гуманізованому антитілі замінені відповідними залишками з антитіла, що не є людським (наприклад, антитіла, з якого походять залишки HVR), наприклад, для відновлення або покращення специфічності або афінності антитіла.

Огляд гуманізованих антитіл і способів їх одержання робиться, наприклад, в Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633 і додатково описується, наприклад, в

30 Riechmann, I. et al., Nature 332 (1988) 323-329; Queen, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033; патентах США № 5821337, 7527791, 6982321 і 7087409; Kashmiri, S.V. et al., Methods 36 (2005) 25-34 (що описує пересадження SDR (а-CDR) (ділянка, що визначає специфічність)); Padlan, E.A., Mol. Immunol. 28 (1991) 489-498 (що описує "змінені поверхні (варіабельного домену)»); Dall'Acqua, W.F. et al., Methods 36 (2005) 43-60 (що описує "перетасування FR"); і Osbourn, J. et al., Methods 36 (2005) 61-68 і Klimka, A. et al., Br. J. Cancer

35 83 (2000) 252-260 (що описує підхід "направленого відбору" для перетасування FR).

Людські каркасні ділянки, які можна використовувати для гуманізації, включають каркасні ділянки, відібрані з використанням способу "найкращої апроксимації" (див., наприклад, Sims, M.J. et al., J. Immunol. 151 (1993) 2296-2308; каркасні ділянки, що походять з консенсусної

40 послідовності варіабельних ділянок легкого або важкого ланцюга конкретної підгрупи людських антитіл (див., наприклад, Carter, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; і Presta, L.G. et al., J. Immunol. 151 (1993) 2623-2632); людські зрілі (що соматично мутували) каркасні ділянки або людські каркасні ділянки зародкової лінії (див., наприклад, Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633); і каркасні ділянки, одержані в результаті скринінгу бібліотек FR (див., наприклад, Baca, M. et al., J. Biol. Chem. 272 (1997) 10678-10684 і Rosok, M.J. et al., J. Biol. Chem. 271 (1996) 22611-22618), але не обмежуються ними.

### 4. Людські антитіла

У деяких втіленнях антитіло, запропоноване в даному документі, являє собою людське антитіло. Людські антитіла можуть бути одержані з використанням різних методик, відомих в

50 даній галузі. Людські антитіла у загальному описуються в van Dijk, M.A. and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374 і Lonberg, N., Curr. Opin. Immunol. 20 (2008) 450-459.

Людські антитіла можуть бути одержані введенням імуногена трансгенним тваринам, які були модифіковані для продукції інтактних людських антитіл або інтактних антитіл з людськими варіабельними ділянками у відповідь на антигенну стимуляцію. Такі тварини типово містять всі

55 локуси людського імуноглобуліну або їх частини, які заміняють локуси ендегенних імуноглобулінів, або які присутні позахромосомно або випадковим чином інтегрують в хромосоми тварини. У таких трансгенних мишей локуси ендегенних імуноглобулінів звичайно були інактивовані. Відносно огляду способів одержання людських антитіл з трансгенних тварин див. Lonberg, N., Nat. Biotech. 23 (2005) 1117-1125. Див. також, наприклад, патенти США № 6075181 і 6150584, що описують технологію XENOMOUSE™; патент США № 5770429, що

60

описує технологію HuMab®; патент США № 7041870, що описує технологію K-M MOUSE®, і публікацію заявки на патент США № US 2007/0061900, що описує технологію VelociMouse®). Людські варіабельні ділянки з інтактних антитіл, одержані за допомогою таких тварин, можуть бути додатково модифіковані, наприклад, за допомогою поєднання з іншою людською константною ділянкою.

Людські антитіла також можуть бути одержані способами на основі гібридоми. Були описані людські мієломні і мишино-людські гетеромієломні лінії клітин для продукції людських моноклональних антитіл. (див. наприклад, Kozbor, D., J. Immunol. 133 (1984) 3001-3005; Brodeur, B.R. et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York (1987), pp. 51-63 і Boerner, P. et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Людські антитіла, одержані за допомогою технології людської В-клітинної гібридоми, також описуються в Li, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006) 3557-3562. Додаткові способи включають способи, описані, наприклад, в патенті США № 7189826 (що описує продукцію моноклональних людських антитіл IgM з гібридомних ліній клітин) і Ni, J., Xiandai Mianyixue 26 (2006) 265-268 (що описує людсько-людські гібридоми). Технологія людської гібридоми (технологія триоми) також описується в Vollmers, H.P. and Brandlein, S., Histology and Histopathology 20 (2005) 927-937 і Vollmers, H.P. and Brandlein, S., Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27 (2005) 185-191.

Людські антитіла також можуть бути одержані за допомогою виділення послідовностей варіабельного домену клону Fv, відібраних з бібліотек фагового дисплея людського походження. Такі послідовності варіабельного домену можна потім поєднувати з бажаним людським константним доменом. Методики відбору людських антитіл з бібліотек антитіл описуються нижче.

#### 5. Антитіла, одержані з бібліотеки

Антитіла за винаходом можуть бути виділені за допомогою скринінгу комбінаторних бібліотек антитіл з бажаною активністю або активностями. Наприклад, в даній галузі відома ціла низка способів для одержання бібліотек фагового дисплея і скринінгу таких бібліотек на антитіла, які мають бажані характеристики зв'язування. Огляд таких способів здійснюється, наприклад, в Hoogenboom, H.R. et al., Methods in Molecular Biology 178 (2001) 1-37, і вони додатково описуються, наприклад, в McCafferty, J. et al., Nature 348 (1990) 552-554; Clackson, T. et al., Nature 352 (1991) 624-628; Marks, J.D. et al., J. Mol. Biol. 222 (1992) 581-597; Marks, J.D. and Bradbury, A., Methods in Molecular Biology 248 (2003) 161-175; Sidhu, S.S. et al., J. Mol. Biol. 338 (2004) 299-310; Lee, C.V. et al., J. Mol. Biol. 340 (2004) 1073-1093; Fellouse, F.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 12467-12472 і Lee, C.V. et al., J. Immunol. Methods 284 (2004) 119-132.

У деяких способах фагового дисплея репертуари генів VH і VL роздільно клонуються полімеразною ланцюговою реакцією (ПЦР) і випадковим чином рекомбінують у фагові бібліотеки, які потім можна піддавати скринінгу на антигензв'язуючий фаг, як описано в Winter, G. et al., Ann. Rev. Immunol. 12 (1994) 433-455. Фаг типово піддає дисплею фрагменти антитіл або у вигляді одноланцюжкових фрагментів Fv (scFv), або у вигляді фрагментів Fab. Бібліотеки з імунізованих джерел надають високоафінні антитіла до імуногену без необхідності конструювання гібридом. Як альтернатива, може бути клонований наївний репертуар (наприклад, від людини) з наданням одного джерела антитіл на широкий спектр чужорідних і також власних антигенів без будь-якої імунізації, як описано Griffiths, A.D. et al., EMBO J. 12 (1993) 725-734. Нарешті, наївні бібліотеки також можуть бути одержані синтетично за допомогою клонування таких, що не піддавалися реаранжуванню сегментів V-генів із стовбурових клітин і застосування праймерів ПЦР, які містять випадкову послідовність, для кодування сильно варіабельних ділянок CDR3 і для здійснення реаранжування *in vitro*, як описано Hoogenboom, H.R. and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388. Патентні публікації, що описують фагові бібліотеки людських антитіл, включають, наприклад: патент США № 5750373 і патентні публікації США № 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 і 2009/0002360.

Антитіла або фрагменти антитіл, виділені з бібліотек людських антитіл, вважаються в даному документі людськими антитілами або фрагментами людських антитіл.

#### 6. Мультиспецифічні антитіла

У деяких втіленнях антитіло, запропоноване в даному документі, являє собою мультиспецифічне антитіло, наприклад, біспецифічне антитіло. Мультиспецифічні антитіла являють собою моноклональні антитіла, які мають специфічності зв'язування відносно щонайменше двох різних сайтів. У деяких втіленнях одна із специфічностей зв'язування направлена відносно PD1, і інша - відносно будь-якого іншого антигену. У деяких втіленнях біспецифічні антитіла можуть зв'язуватися з двома різними епітопами PD1. Біспецифічні

антитіла також можуть використовуватися для локалізації цитотоксичних агентів у клітинах, які експресують PD1. Біспецифічні антитіла можна одержувати у вигляді повнорозмірних антитіл або фрагментів антитіл.

Методики одержання мультиспецифічних антитіл включають рекомбінантну співекспресію двох пар важкого ланцюга-легкого ланцюга імуноглобуліну, які мають різні специфічності (див. Milstein, C. and Cuellar, A.C., Nature 305 (1983) 537-540, WO 93/08829 і Traunecker, A. et al., EMBO J. 10 (1991) 3655-3659), і генетичну інженерію "виступ у западину" (див., наприклад, патент США № 5731168). Мультиспецифічні антитіла також можна одержувати інженерією ефектів електростатичного наведення для одержання Fc-гетеродимерних молекул антитіла (WO 2009/089004); поперечним зв'язуванням двох або більше ніж двох антитіл або фрагментів (див., наприклад, патент США № 4676980 і Brennan, M. et al., Science 229 (1985) 81-83); застосуванням лейцинових блискавок для одержання біспецифічних антитіл (див., наприклад, Kostelny, S.A. et al., J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553; застосуванням технології "діатіла" для одержання біспецифічних фрагментів антитіл (див., наприклад, Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448) і застосуванням димерів одноланцюжкових Fv (sFv) (див., наприклад, Gruber, M et al., J. Immunol. 152 (1994) 5368-5374); і одержанням триспецифічних антитіл, як описано, наприклад, в Tutt, A. et al., J. Immunol. 147 (1991) 60-69).

У даний документ також включені генетично модифіковані антитіла з трьома або більше ніж трьома функціональними антигензв'язуючими сайтами, що включають "антитіла-восьминоги" (див., наприклад, US 2006/0025576).

Антитіло або фрагмент у даному документі також включає "Fab подвійної дії" або "DAF", який містить антигензв'язуючий сайт, який зв'язується з PD1, а також з іншим, відмінним антигеном (див., наприклад, US 2008/0069820).

Антитіло або фрагмент у даному документі також включає мультиспецифічні антитіла, описані в WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 і WO 2010/145793, WO2011/117330, WO2012/025525, WO2012/025530, WO2013/026835, WO2013/026831, WO2013/164325 або WO 2013/174873.

#### 7. Варіанти антитіл

У деяких втіленнях розглядаються запропоновані в даному документі варіанти амінокислотної послідовності антитіл. Наприклад, може бути бажаним покращення афінності зв'язування і/або інших біологічних властивостей антитіла. Варіанти амінокислотної послідовності антитіла можуть бути одержані введенням придатних модифікацій в нуклеотидну послідовність, кодуючу антитіло, або за допомогою пептидного синтезу. Такі модифікації включають, наприклад, делеції з і/або вставки в, і/або заміни залишків у межах амінокислотних послідовностей антитіла. Можна зробити будь-яку комбінацію делеції, вставки і заміни для одержання кінцевої конструкції, за умови, що дана кінцева конструкція має бажані характеристики, наприклад, зв'язування антигену.

##### а) Варіанти із заміною, вставкою і делецією

У деяких втіленнях запропоновані варіанти антитіла, які мають одну або більше ніж одну амінокислотну заміну. Сайти для мутагенезу, що цікавлять, який призводить до заміни, включають HVR і FR. В Таблиці 1 наводяться типові заміни під заголовком "типові заміни", і, як описано далі нижче по відношенню до класів бокових ланцюгів амінокислот. Консервативні заміни показані в Таблиці 1 під заголовком "переважні заміни". В антитіло, що цікавить, можуть бути введені амінокислотні заміни, і продукти піддаються скринінгу відносно бажаної активності, наприклад, збереженого/покращеного зв'язування антигену, зниженої імуногенності або покращеної ADCC (антитілозалежна клітинна цитотоксичність) або CDC (комплементзалежна цитотоксичність).

Таблиця 1

Вихідний залишок	Типові заміни	Переважаючі заміни
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp

Таблиця 1

Вихідний залишок	Типові заміни	Переважні заміни
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Амінокислоти можуть бути згруповані згідно із загальними властивостями бокового ланцюга:

(1) гідрофобні: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) кислотні: Asp, Glu;

(4) основні: His, Lys, Arg;

(5) залишки, які впливають на орієнтацію ланцюга: Gly, Pro;

(6) ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативні заміни будуть тягнути за собою заміну члена одного з даних класів на інший клас.

Один тип варіанта із замінами включає заміну одного або більше ніж одного залишку гіперваріабельної ділянки батьківського антитіла (наприклад, гуманізованого або людського антитіла). У загальному, одержаний(ні) в результаті варіант(ти), відібраний(ні) для подальшого дослідження, буде(дуть) мати модифікації (наприклад, покращення) деяких біологічних властивостей (наприклад, підвищену афінність, знижену імуногенність) відносно батьківського антитіла і/або буде(дуть) мати по суті визначені біологічні властивості батьківського антитіла, що зберігаються. Типовим варіантом із замінами є антитіло з дозрілою афінністю, яке може бути із зручністю одержане, наприклад, з використанням методик дозрівання афінності на основі фагового дисплея, таких як методики, описані в даному документі. Стисло, один або більше ніж один залишок HVR мутується, варіанти антитіла піддаються дисплею на фагу і піддаються скринінгу на визначену біологічну активність (наприклад, афінність зв'язування).

Зміни (наприклад, заміни) можуть бути зроблені в HVR, наприклад, для покращення афінності антитіла. Такі зміни можуть бути зроблені в "гарячих точках" HVR, тобто залишках, що кодуються кодонами, які з високою частотою піддаються мутації під час процесу соматичного дозрівання (див., наприклад, Chowdhury, P.S., Methods Mol. Biol. 207 (2008) 179-196), і/або SDR (а-CDR), причому одержані в результаті варіанти VH або VL тестуються на афінність зв'язування. Дозрівання афінності за допомогою конструювання і повторного відбору з вторинних бібліотек було описане, наприклад, в Hoogenboom, H.R. et al. в Methods in Molecular Biology 178 (2002) 1-37. У деяких втіленнях дозрівання афінності у вибрані для дозрівання варіабельні гени вводиться різноманітність за допомогою будь-якого з цілої низки способів (наприклад, ПЦР, схильна до помилок, перетасування ланцюга або мутагенез, що керується олігонуклеотидом). Потім створюється вторинна бібліотека. Дана бібліотека потім піддається скринінгу для ідентифікації будь-яких варіантів антитіла з бажаною афінністю. Інший спосіб введення різноманітності включає підходи, направлені на HVR, в яких рандомізуються декілька залишків HVR (наприклад, 4-6 залишків за раз). Залишки HVR, що беруть участь в зв'язуванні антигену, можуть бути специфічно ідентифіковані, наприклад, з використанням мутагенезу на основі аланінового сканування або моделювання. Зокрема, часто як мішень використовуються CDR-H3 і CDR-L3.

У деяких втіленнях заміни, вставки або делеції можуть відбуватися в межах одної або більше ніж одної HVR, за умови, що такі зміни по суті не зменшують здатність антитіла до зв'язування антигену. Наприклад, в HVR можуть бути зроблені консервативні зміни (наприклад, консервативні заміни, як запропоновано в даному документі), які по суті не зменшують афінність зв'язування. Такі зміни можуть знаходитися поза "гарячих точок" HVR або SDR. У деяких

втіленнях варіантів послідовностей VH і VL, запропонованих вище, кожний HVR або є незмінною, або містить не більше, ніж одну, дві або три амінокислотні заміни.

Корисний спосіб ідентифікації залишків або ділянок антитіла, які можуть служити як мішень для мутагенезу, називається "мутагенезом на основі аланінового сканування", як описано  
 5 Cunningham, B.C. and Wells, J.A., Science 244 (1989) 1081-1085. У даному способі залишок або група залишків-мішеней (наприклад, заряджених залишків, таких як Arg, Asp, His, Lys і Glu) ідентифікується і замінюється нейтральною або негативно зарядженою амінокислотою (наприклад, аланіном або поліаланіном) для визначення того, чи піддається впливу взаємодія антитіла з антигеном. Додаткові заміни можуть бути введені в положеннях амінокислот,  
 10 демонструючих функціональну чутливість до вихідних замін. Як альтернатива або додатково, може бути визначена кристалічна структура комплексу антиген-антитіло для ідентифікації контактних точок між антитілом і антигеном. Такі контактні залишки і сусідні залишки можуть служити як мішень або усуватися як кандидати для заміни. Варіанти можуть бути піддані скринінгу для визначення того, чи мають вони бажані властивості.

15 Вставки в амінокислотну послідовність включають аміно- і/або карбоксикінцеві злиття, які варіюються за довжиною від одного залишку до поліпептидів, які містять сто або більше ніж сто залишків, а також вставки всередині послідовності одиночних або багатьох амінокислотних залишків. Приклади кінцевих вставок включають антитіло з N-кінцевим метіонільним залишком. Інші вставні варіанти молекули антитіла включають злиття з N- або C-кінцем антитіла ферменту  
 20 (наприклад, для ADEPT (антитілоопосередкована терапія з використанням ферментів і проліків)) або поліпептиду, який збільшує період напівведення антитіла у сироватці.

#### б) Варіанти ділянки Fc

У деяких втіленнях в ділянку Fc антитіла, запропонованого в даному документі, можуть бути введені одна або більше ніж одна амінокислотна модифікація, генеруючи, за допомогою цього,  
 25 варіант ділянки Fc. Даний варіант ділянки Fc може містити послідовність людської ділянки Fc (наприклад, ділянки Fc людського IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4), яка містить амінокислотну модифікацію (наприклад, заміну) в одному або більше ніж одному положенні амінокислоти.

Антитіла із зниженою ефекторною функцією включають антитіла із заміною одного або більше ніж одного залишку ділянки Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 і 329 (патент США №  
 30 6737056). Такі мутанти Fc включають мутантів Fc із замінами в двох або більше ніж двох положеннях амінокислот 265, 269, 270, 297 і 327, включаючи так званий мутант Fc "DANA" із заміною залишків 265 і 297 на аланін (патент США № 7332581).

Описані деякі варіанти антитіл з покращеним або зменшеним зв'язуванням з FcR. (див.,  
 35 наприклад, патент США № 6737056; WO 2004/056312 і Shields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604).

В одному втіленні винаходу таке антитіло являє собою IgG1 з мутаціями L234A і L235A або з мутаціями L234A, L235A і P329G. В іншому втіленні запропонований IgG4 з мутаціями S228P і L235E або S228P, L235E і/або P329G (нумерація згідно з індексом EU, Kabat et al., Sequences of  
 40 Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

Антитіла із збільшеними періодами напівведення і покращеним зв'язуванням з неонатальним рецептором Fc (FcRn), який відповідає за перенесення материнських IgG в плід (Guyer, R.L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593 і Kim, J.K. et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434), описуються в US 2005/0014934. Дані антитіла містять ділянку Fc з одною або більше ніж  
 45 одною заміною в ній, яка покращує зв'язування ділянки Fc з FcRn. Такі варіанти Fc включають варіанти із замінами в одному або більше ніж одному залишку Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 або 434, наприклад, із заміною залишку 434 ділянки Fc (патент США № 7371826).

Див. також Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; US 5648260; US 5624821 і  
 50 WO 94/29351 відносно інших прикладів варіантів ділянки Fc.

#### в) Варіанти антитіл, модифіковані за цистеїном

У деяких втіленнях може бути бажаним утворення антитіл, модифікованих за цистеїном, наприклад, "тіоМАб", в яких один або більше ніж один залишок антитіла замінений залишками цистеїну. У конкретних втіленнях замінені залишки зустрічаються в доступних сайтах антитіла.  
 55 За допомогою заміни даних залишків на цистеїн реакційноздатні тіольні групи розташовуються в доступних сайтах антитіла і можуть бути використані для кон'югування антитіла з іншими групуваннями, такими як групування лікарських засобів або групування лінкер-лікарський засіб, з утворенням імунокон'югата, як описано в даному документі далі. У деяких втіленнях будь-який один або більше ніж один з наступних залишків може бути замінений на цистеїн: V205  
 60 (нумерація за Kabat) легкого ланцюга; A118 (нумерація EU) важкого ланцюга і S400 (нумерація



EU) важкого ланцюга ділянки Fc. Антитіла, модифіковані за цистеїном, можуть бути одержані, як описано, наприклад, в патенті США № 7521541.

г) Похідні антитіл

У деяких втіленнях запропоноване в даному документі антитіло може бути додатково модифіковане так, щоб воно містило додаткові небілкові групування, які відомі в даній галузі і є легко доступними. Групування, придатні для дериватизації антитіла, включають водорозчинні полімери, але не обмежуються ними. Необмежувальні приклади водорозчинних полімерів включають поліетиленгліколь (PEG), співполімери етиленгліколю/пропіленгліколю, карбоксиметилцелюлозу, декстран, полівініловий спирт, полівінілпіролідон, полі-1, 3-діоксолан, полі-1,3,6-триоксан, співполімер етилену/малеїнового ангідриду, поліамінокислоти (або гомополімери, або випадкові співполімери) і декстран або полі(н-вінілпіролідон)поліетиленгліколь, гомополімери пропіленгліколю, співполімери поліпропіленоксиду/етиленоксиду, поліоксиетильовані поліоли (наприклад, гліцерин), полівініловий спирт та їх суміші, але не обмежуються ними. Поліетиленглікольпропіональдегід може мати переваги у виробництві через його стабільність у воді. Полімер може мати будь-яку молекулярну масу і може бути розгалуженим або нерозгалуженим. Кількість полімерів, приєднаних до антитіла, може варіювати, і, при приєднанні більше ніж одного полімеру, вони можуть бути однаковими або різними молекулами. У загальному, число і/або тип полімерів, що використовуються для дериватизації, можуть визначатися на основі міркувань, які включають конкретні властивості або функції антитіла, що підлягають покращенню, але не обмежуються ними, незалежно від того, чи буде похідне антитіла використовуватися в терапії за визначених умов, тощо.

В іншому втіленні запропоновані кон'югати антитіла і небілкового групування, яке може бути селективно нагріте під впливом радіації. В одному втіленні небілкове групування являє собою вуглецеву нанотрубку (Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). Радіація може мати будь-яку довжину хвилі і включає довжини хвиль, які не завдають шкоди звичайним клітинам, але які нагрівають небілкове групування до температури, при якій умиротворяються клітини, прибіжені до небілкового групування антитіла, але не обмежуються ними.

Б. Способи та композиції генної інженерії

Антитіла можуть бути одержані з використанням способів та композицій генної інженерії, наприклад, як описано в патенті США № 4816567. В одному втіленні запропонована виділена нуклеїнова кислота, кодує антитіло до PD1, описане в даному документі. Така нуклеїнова кислота може кодувати амінокислотну послідовність, яка містить VL, і/або амінокислотну послідовність, яка містить VH антитіла (наприклад, легкий і/або важкий ланцюг антитіла). В іншому втіленні запропонований один або більше ніж один вектор (наприклад, експресійний вектор), який містить таку нуклеїнову кислоту. В іншому втіленні запропонована клітина-хазяїн, яка містить таку нуклеїнову кислоту. В одному такому втіленні клітина-хазяїн містить (наприклад, була трансформована): (1) вектором, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, яка містить VL антитіла, і амінокислотну послідовність, яка містить VH антитіла, або (2) перший вектор, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, яка містить VL антитіла, і другий вектор, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, яка містить VH антитіла. В одному втіленні клітина-хазяїн є еукаріотичною, наприклад, клітиною яєчника китайського хом'яка (CHO) або лімфоїдною клітиною (наприклад, клітиною Y0, NS0, Sp20). В одному втіленні запропонований спосіб одержання антитіла до PD1, де даний спосіб включає культивування клітини-хазяїна, яка містить нуклеїнову кислоту, кодує антитіло, як запропоновано вище, за придатних умов для експресії антитіла и, можливо, виділення антитіла з клітини-хазяїна (або культурального середовища клітини-хазяїна).

Для рекомбінантної продукції антитіла до PD1 нуклеїнову кислоту, кодує антитіло, наприклад, як описано вище, виділяють і вставляють в один або більше ніж один вектор для подальшого клонування і/або експресії в клітині-хазяїні. Таку нуклеїнову кислоту можна легко виділяти і секвенувати з використанням традиційних методик (наприклад, за допомогою застосування олігонуклеотидних зондів, які здатні до специфічного зв'язування з генами, кодує важкий і легкий ланцюг антитіла).

Придатні клітини-хазяї для клонування або експресії векторів, кодує антитіло, включають прокаріотичні або еукаріотичні клітини, описані в даному документі. Наприклад, антитіла можуть бути продуковані в бактеріях, зокрема, коли не потрібне глікозилювання та ефекторна функція Fc. Відносно експресії фрагментів антитіла і поліпептидів у бактеріях, див., наприклад, US 5648237, US 5789199 і US 5840523. (див. також Charlton, K.A., In: Methods in

Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254, що описує експресію фрагментів антитіла в *E. coli*). Після експресії антитіло може бути виділене з пасти бактеріальних клітин в розчинній фракції і може бути додатково очищене.

Крім прокаріотів, придатними хазяями клонування або експресії для векторів, кодуючих антитіло, є еукаріотичні мікроби, такі як нитчасті грибки або дріжджі, що включають штами грибків і дріжджів, шляхи глікозилювання яких були "гуманізовані", призводячи до продукції антитіла з частково або повністю людською картиною глікозилювання. Див. Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414 і Li, H. et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215.

Придатні клітини-хазяї для експресії глікозилюваного антитіла також походять з багатоклітинних організмів (безхребетних і хребетних). Приклади клітин безхребетних включають клітини рослин і комах. Були ідентифіковані багаточисленні бакуловірусні штами, які можна використовувати у поєднанні з клітинами комах, зокрема, для трансфекції клітин *Spodoptera frugiperda*.

Як хазяїв також можна використовувати культури клітин рослин. Див., наприклад, патенти США № 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 і 6417429 (що описують технологію PLANTIBODIES™ для продукування антитіл в трансгенних рослинах).

Як хазяїв також можна використовувати клітини хребетних. Наприклад, можуть бути корисними лінії клітин ссавців, які адаптовані для росту в суспензії. Іншими прикладами корисних ліній клітин-хазяїв ссавців є лінія нирки мавпи CV1, трансформована SV40 (COS-7); лінія ембріональної нирки людини (293 або клітини 293, як описано, наприклад, в Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74); клітини ембріональної нирки хом'яка (BHK); мишині клітини сертолі (клітини TM4, як описано, наприклад, в Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252); клітини нирки мавпи (CV1); клітини нирки африканської зеленої мартишки (VERO-76); клітини карциноми шийки матки людини (HELA); клітини нирки собаки (MDCK); клітини печінки сірого щура (BRL 3A); клітини легені людини (W138); клітини печінки людини (Hep G2); клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562); клітини TRI, як описано, наприклад, в Mather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68; клітини MRC 5 і клітини FS4. Інші корисні лінії клітин-хазяїв ссавців включають клітини яєчника китайського хом'яка (CHO), що включають клітини CHO DHFR<sup>-</sup> (негативні за дегідрофолатредуктазою) (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220), і мієломні лінії клітин, такі як Y0, NS0 і Sp2/0. Відносно огляду визначених ліній клітин-хазяїв ссавців, придатних для продукції антитіл, див., наприклад, Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

#### В. Аналізи

Запропоновані в даному документі антитіла до PD1 можуть бути ідентифіковані, піддані скринінгу або охарактеризовані на їх фізичні/хімічні властивості і/або біологічні активності за допомогою різних аналізів, відомих в даній галузі.

#### 1. Аналізи зв'язування та інші аналізи

В одному аспекті антитіло за винаходом тестується на його активність зв'язування антигену, наприклад, відомими способами, такими як ELISA (твердофазний імуноферментний аналіз), вестерн-блотинг тощо.

В іншому аспекті можна використовувати конкурентні аналізи для ідентифікації антитіла, яке конкурує з PD1-0103 (яке містить послідовність VH SEQ ID NO:7 і послідовність VL SEQ ID NO:8) за зв'язування з PD1 (або, як альтернатива, з гуманізованими варіантами PD1-0103 - антитілами PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314, PD1-0103-0315 з ідентичними 5-6 HVR). Одним втіленням винаходу є антитіло, яке конкурує за зв'язування з PD1 людини з антитілом до PD1, яке містить всі 3 HVR послідовності VH SEQ ID NO:7 і всі 3 HVR послідовності VL SEQ ID NO:8. Одним втіленням винаходу є антитіло, яке конкурує за зв'язування з PD1 людини з антитілом до PD1, яке містить всі 3 HVR послідовності VH SEQ ID NO:57 і всі 3 HVR послідовності VL SEQ ID NO:58. У деяких втіленнях таке конкуруюче антитіло зв'язується з тим самим епітопом (наприклад, лінійним або конформаційним епітопом), з яким зв'язується антитіло до PD1 PD1-0103. Докладні типові способи картування епітопа, з яким зв'язується антитіло, наводяться в Morris, G.E. (ed.), Epitope Mapping Protocols, In: Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Humana Press, Totowa, NJ (1996).

В типовому конкурентному аналізі іммобілізований PD1(-ECD) інкубується в розчині, який містить перше мічене антитіло, яке зв'язується з PD1 (наприклад, антитіло до PD1 PD1-0103 або гуманізоване антитіло PD1-0103-0312), і друге немічене антитіло, яке тестується на його здатність конкурувати з першим антитілом за зв'язування з PD1. Друге антитіло може бути присутнім в супернатанті гібридоми. Як контроль іммобілізований PD1 інкубується в розчині, який містить перше мічене антитіло, але не друге немічене антитіло. Після інкубування за

пермисивних умов для зв'язування першого антитіла з PD1 видаляється надлишок антитіла, що не зв'язується, і вимірюється кількість мітки, асоційованої з іммобілізованим PD1. Якщо кількість мітки, асоційованої з іммобілізованим PD1, суттєво знижується в дослідному зразку відносно контрольного зразка, тоді це вказує на те, що друге антитіло є конкуруючим з першим антитілом за зв'язування з PD1. Див. Harlow, E. and Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988). Відносно другого типового конкурентного аналізу див. Приклад 2 (ELISA картування епітопів/конкурентний аналіз зв'язування).

## 2. Аналізи активності

В одному аспекті запропоновані аналізи для ідентифікації антитіл до PD1, які мають біологічну активність. Біологічна активність може включати, наприклад, здатність до посилення активації і/або проліферації різних імунних клітин, особливо Т-клітин. Наприклад, вони посилюють секрецію імуномодуючих цитокінів (наприклад, інтерферону-гамма (IFN-гамма) і/або фактора некрозу пухлин альфа (TNF альфа)). Іншими імуномодуючими цитокінами, рівень яких збільшується або може бути збільшений, є, наприклад, IL-12, гранзим В тощо. Біологічна активність також може включати перехресну реактивність при зв'язуванні з антигенами яванського макака, а також зв'язування з другими типами клітин. Також надаються антитіла, які мають таку біологічну активність *in vivo* і/або *in vitro*.

У деяких втіленнях антитіло за винаходом тестується на таку біологічну активність, як описано, наприклад, нижче в Прикладах.

### Г. Імунокон'югати (тільки рак або модифікація відносно мішені)

Згідно з винаходом також запропоновані імунокон'югати, які містять антитіло до PD1, як описано в даному документі, кон'юговане з одним або більше ніж одним цитотоксичним агентом, таким як хіміотерапевтичні агенти або лікарські засоби, агенти, інгібуючі ріст, токсини (наприклад, білкові токсини, ферментативно активні токсини бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження, або їх фрагменти) або радіоактивні ізотопи.

В одному втіленні імунокон'югат являє собою кон'югат антитіло-лікарський засіб (ADC), в якому антитіло кон'юговане з одним або більше ніж одним лікарським засобом, що включає майтансиноід (див. US 5208020, US 5416064 і EP 0 425 235 B1); ауристин, такий як монометильні лікарські групування ауристину DE і DF (MMAE і MMAF) (див. US 5635483, US 5780588 і US 7498298); доластин; каліхеаміцин або його похідне (див. US 5712374, US 5714586, US 5739116, US 5767285, US 5770701, US 5770710, US 5773001 і US 5877296; Hinman, L.M. et al., *Cancer Res.* 53 (1993) 3336-3342 і Lode, H.N. et al., *Cancer Res.* 58 (1998) 2925-2928); антрациклін, такий як дауномицин або доксорубіцин (див. Kratz, F. et al., *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 477-523; Jeffrey, S.C. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 358-362; Torgov, M.Y. et al., *Bioconjug. Chem.* 16 (2005) 717-721; Nagy, A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 829-834; Dubowchik, G.M. et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12 (2002) 1529-1532; King, H.D. et al., *J. Med. Chem.* 45 (2002) 4336-4343 і патент США № 6630579); метотрексат; віндезин; таксан, такий як доцетаксел, паклітаксел, ларотаксел, тезетаксел та ортатаксел; трихотецен і CC1065, але не обмежується ними.

В іншому втіленні імунокон'югат містить антитіло, як описано в даному документі, кон'юговане з ферментативно активним токсином або його фрагментом, що включає ланцюг А дифтерійного токсину, активні фрагменти дифтерійного токсину, що не зв'язуються, ланцюг А екзотоксину (з *Pseudomonas aeruginosa*), ланцюг А рицину, ланцюг А абрину, ланцюг А модексину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, діантинові білки, білки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор *Momordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор *Saponaria officinalis*, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еномфіцин і трикотецени, але що обмежується ними.

В іншому втіленні імунокон'югат містить антитіло, як описано в даному документі, кон'юговане з радіоактивним атомом, з утворенням радіокон'югата. Для одержання радіокон'югатів доступна ціла низка радіоактивних ізотопів. Приклади включають  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bj^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  і радіоактивні ізотопи Lu. При використанні радіокон'югата для виявлення, він може містити радіоактивний атом для сцинтиграфічних досліджень, наприклад,  $Tc^{99m}$  або  $I^{123}$ , або спінову мітку для візуалізації за допомогою ядерного магнітного резонансу (ЯМР) (також відомого як магнітно-резонансна томографія), таку як знову-таки йод-123, йод-131, індій-111, фтор-19, вуглець-13, азот-15, кисень-17, гадоліній, марганець або залізо.

Кон'югати антитіла і цитотоксичного агента можна одержувати з використанням цілої низки біфункціональних агентів зв'язування з білком, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилтіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)-циклогексан-1-карбоксилат

(SMCC), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні імідоефірів (такі як диметиладипімідат HCl), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глутаральдегід), біс-азидосполуки (такі як біс-(п-азидобензоїл)гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс-(п-діазонійбензоїл)-етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол 2,6-діізоціанат) і біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад, імунотоксин рицин може бути одержаний, як описано в Vitetta, E.S. et al., Science 238 (1987) 1098-1104. Мічена вуглецем-14 1-ізоціанатобензил-3-метилдіетилентріамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA) являє собою типовий хелатуючий агент для кон'югування радіонуклеїду з антитілом. Див. WO 94/11026. Лінкер може являти собою "розщеплювальний лінкер", що полегшує вивільнення цитотоксичного лікарського засобу в клітині. Наприклад, можна використовувати кислотолабільний лінкер, чутливий до пептидази лінкер, фотоллабільний лінкер, диметильний лінкер або дисульфідвмісний лінкер (Chari, R.V. et al., Cancer Res. 52 (1992) 127-131; патент США № 5208020).

Серед імунокон'югатів або ADC в даному документі прямо розглядаються кон'югати, одержані з використанням реактивів, що поперечно зв'язуються, але не обмежуються ними, які включають BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC, сульфо-SMPB і SVSB (сукцинімідил-(4-вінілсульфон)бензоат), але не обмежуються ними, які наявні у продажу (наприклад, у Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., США).

Д. Способи та композиції для діагностики і виявлення

У деяких втіленнях будь-яке із запропонованих в даному документі антитіл до PD1 є корисним для виявлення присутності PD1 в біологічному зразку. Термін "виявлення" в тому вигляді, в якому він використовується в даному документі, охоплює кількісне або якісне виявлення. У деяких втіленнях біологічний зразок містить клітину або тканину, таку як, імунна клітина або інфільтрати Т-клітин.

В одному втіленні запропоноване антитіло до PD1 для застосування у способі діагностики або виявлення. В іншому аспекті запропонований спосіб виявлення присутності PD1 в біологічному зразку. У деяких втіленнях даний спосіб включає приведення біологічного зразка в контакт з антитілом до PD1, як описано в даному документі, за пермисивних умов для зв'язування антитіла до PD1 з PD1 і виявлення того, чи утворюється комплекс між антитілом до PD1 і PD1. Такий спосіб може являти собою спосіб *in vitro* або *in vivo*. В одному втіленні антитіло до PD1 використовується для відбору суб'єктів, придатних для терапії антитілом до PD1, наприклад, де PD1 являє собою біомаркер для відбору пацієнтів.

У деяких втіленнях запропоновані мічені антитіла до PD1. Мітки включають мітки або групування, які виявляються безпосередньо (такі як флуоресцентні, хромофорні, електронношільні, хемілюмінісцентні та радіоактивні мітки), а також групування, такі як ферменти або ліганди, які виявляються опосередковано, наприклад, через ферментативну реакцію або молекулярну взаємодію, але не обмежуються ними. Типові мітки включають радіоізотопи  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  і  $^{131}\text{I}$ , флуорофори, такі як хелати рідкоземельних металів або флуоресцеїн та їх похідні, родамін та його похідні, дансил, умбеліферон, люциферази, наприклад, люциферазу світляка і бактеріальну люциферазу (патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигідрофалазіндіони, пероксидазу хрину (HRP), лужну фосфатазу,  $\beta$ -галактозидазу, глюкоамілазу, ліоцим, сахаридоксидази, наприклад, глюкозооксидазу, галактозооксидазу і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу, гетероциклічні оксидази, такі як уриказу і ксантиноксидазу, зв'язані з ферментом, який використовує пероксид водню для окиснення попередника барвника, таким як HRP (пероксидаза хрину), лактопероксидаза або мікропероксидаза, біотин/авідин, спінові мітки, бактеріофагові мітки, стабільні вільні радикали і тому подібне, але не обмежуються ними.

Е. Фармацевтичні препарати

Фармацевтичні препарати антитіла до PD1, як описано в даному документі, одержують змішуванням такого антитіла, яке має бажаний ступінь чистоти, з одним або більше ніж одним можливим фармацевтично прийнятним носієм (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>th</sup> edition, Osol, A. (ed.) (1980)), у формі ліофілізованих препаратів або водних розчинів. Фармацевтично прийнятні носії звичайно є нетоксичними для реципієнтів у застосовуваних дозуваннях і концентраціях і включають: буфери, такі як фосфатний, цитратний і на основі інших органічних кислот; антиоксиданти, що включають аскорбінову кислоту і метіонін; консерванти (такі як октадецилдиметилбензиламонію хлорид; гексаметонію хлорид; бензалконію хлорид; бензетонію хлорид; фенол, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол і м-крезол); низькомолекулярні (менше, ніж приблизно 10 залишків) поліпептиди; білки, такі як сироватковий альбумін, желатин

або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полі(вінілпіролідон); амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, що включають глюкозу, манозу або декстрини; хелатори, такі як EDTA (етилендіамінтетраоцтова кислота); цукри, такі як цукроза, маніт, трегалоза або сорбіт; солеутворюючі протіони, такі як натрій; комплекси металів (наприклад, комплекси Zn-білок); і/або неіонні поверхнево-активні речовини, такі як поліетиленгліколь (PEG), але не обмежуються ними. Типові фармацевтично прийнятні носії в даному документі додатково включають агенти для диспергування лікарського засобу в кишечнику, такі як розчинні нейтрально-активні гіалуронідазні глікопротеїни (sHASEGP), наприклад, людські розчинні гіалуронідазні глікопротеїни PH-20, такі як rhuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Деякі типові sHASEGP та способи застосування, включаючи rhuPH20, описуються в публікаціях патентів США № 2005/0260186 і 2006/0104968. В одному аспекті sHASEGP поєднується з одною або більше ніж одною додатковою глікозаміногліканазою, такою як хондроїтиназа.

Типові ліофілізовані препарати антитіл описуються в патенті США № 6267958. Водні препарати антитіл включають препарати, описані в патенті США № 6171586 і WO 2006/044908, причому останні препарати включають гістидин-ацетатний буфер.

Описаний в даному документі препарат також може містити більше, ніж один активний інгредієнт, необхідний для конкретного показання, яке лікують, переважно інгредієнти із взаємодоповнюючими активностями, які не чинять шкідливого впливу один на одного. Такі активні інгредієнти, придатним чином, присутні в комбінації в кількостях, які є ефективними для наміченої цілі.

Активні інгредієнти можуть бути захоплені в мікрокапсули, одержані, наприклад, методиками коацервації або за допомогою полімеризації на межі розділу фаз, наприклад, в гідроксиметилцелюлозні або желатинові мікрокапсули і в полі-(метилметакрилатні) мікрокапсули відповідно, в колоїдні системи доставки лікарського засобу (наприклад, ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемульсії, наночастинки і нанокапсули) або в макроемульсії. Такі методики розкриті в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>th</sup> edition, Osol, A. (ed.) (1980).

Можуть бути одержані препарати з уповільненим вивільненням. Придатні приклади препаратів з уповільненим вивільненням включають напівпроникні матриці з твердих гідрофобних полімерів, які містять антитіло, які знаходяться у вигляді формованих предметів, наприклад, плівок або мікрокапсул.

Препарати, що підлягають застосуванню для введення *in vivo*, звичайно є стерильними. Стерильність може легко досягатися, наприклад, за допомогою фільтрування через мембрани для стерилізуючого фільтрування.

Ж. Терапевтичні способи та композиції

Будь-яке із запропонованих в даному документі антитіл до PD1 (або антигензв'язуючі білки) можна використовувати у терапевтичних способах.

В одному аспекті запропоноване антитіло до PD1 для застосування як лікарський засіб. В других аспектах запропоноване антитіло до PD1 для застосування в лікуванні раку. У деяких втіленнях запропоноване антитіло до PD1 для застосування у способі лікування. У деяких втіленнях згідно з винаходом запропоноване антитіло до PD1 для застосування у способі лікування індивіда, який має рак, що включає введення даному індивіду ефективної кількості антитіла до PD1.

В інших втіленнях згідно з винаходом запропоноване антитіло до PD1 для застосування як імуностимулюючого агента або стимулюючого секрецію інтерферону-гамма (IFN-гамма). У деяких втіленнях згідно з винаходом запропоноване антитіло до PD1 для застосування у способі імуностимулювання або стимулювання секреції інтерферону-гамма (IFN-гамма) у індивіда, що включає введення даному індивіду ефективної кількості антитіла до PD1 для імуностимулювання або стимулювання секреції інтерферону-гамма (IFN-гамма).

В інших втіленнях згідно з винаходом запропоноване антитіло до PD1 для застосування як імуностимулюючого агента або стимулюючого секрецію фактора некрозу пухлин альфа (TNF альфа). У деяких втіленнях згідно з винаходом запропоноване антитіло до PD1 для застосування у способі імуностимулювання або стимулювання секреції фактора некрозу пухлин альфа (TNF альфа) у індивіда, що включає введення даному індивіду ефективної кількості антитіла до PD1 для імуностимулювання або стимулювання секреції фактора некрозу пухлин альфа (TNF альфа).

"Індивід" згідно з будь-яким з наведених вище втілень переважно являє собою людину. В іншому аспекті згідно з винаходом запропоноване застосування антитіла до PD1 в приготуванні або одержанні лікарського засобу. В одному втіленні даний лікарський засіб призначений для лікування раку. В іншому втіленні лікарський засіб призначений для застосування у способі

лікування раку, що включає введення індивіду, що має рак, ефективного кількості лікарського засобу. В іншому втіленні лікарський засіб призначений для індукування клітинно-опосередкованого лізису ракових клітин. В іншому втіленні лікарський засіб призначений для застосування у способі індукування клітинно-опосередкованого лізису ракових клітин у індивіда, який страждає на рак, що включає введення даному індивіду ефективного кількості лікарського засобу для індукції апоптоза в раковій клітині або для інгібування проліферації ракових клітин. "Індивід" згідно з будь-яким з наведених вище втілень може являти собою людину.

В іншому аспекті згідно з винаходом запропонований спосіб лікування раку. В одному втіленні даний спосіб включає введення індивіда, що має рак, ефективною кількості антитіла до PD1. "Індивід" згідно з будь-яким з наведених вище втілень може являти собою людину.

В іншому аспекті згідно з винаходом запропонований спосіб індукування клітинно-опосередкованого лізису ракових клітин у індивіда, який страждає на рак. В одному втіленні даний спосіб включає введення індивіду ефективною кількості антитіла до PD1 для індукування клітинно-опосередкованого лізису ракових клітин у індивіда, який страждає на рак. В одному втіленні "індивід" являє собою людину.

В іншому аспекті згідно з винаходом запропоновані фармацевтичні препарати, які містять будь-яке із запропонованих в даному документі антитіл до PD1, наприклад, для застосування в будь-якому з наведених вище терапевтичних способів. В одному втіленні фармацевтичний препарат містить будь-яке з запропонованих в даному документі антитіл до PD1 і фармацевтично прийнятний носій.

Антитіло за винаходом (і будь-який додатковий терапевтичний агент) може вводиться будь-якими придатними способами, що включають парентеральне, внутрішньолегеневе та інтраназальне введення і, якщо це бажано для місцевого лікування, - введення в ділянку ураження. Парентеральні інфузії включають внутрішньом'язове, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньочеревне або підшкірне введення. Дозування може здійснюватися будь-яким придатним шляхом, наприклад, за допомогою ін'єкцій, таких як внутрішньовенні або підшкірні ін'єкції, частково залежно від того, чи є введення краткочасним або хронічним. У даному документі розглядаються різні схеми дозування, що включають однократні або багаторазові введення протягом різних моментів часу, болюсне введення та імпульсну інфузію, що але не обмежуються ними.

Антитіла за винаходом були б приготовані, дозовані та введені способом, що узгоджується з належною медичною практикою. У даному контексті фактори для розгляду включають конкретний розлад, який лікують, конкретного ссавця, якого лікують, клінічний стан індивідуального пацієнта, причину розладу, місце доставки агента, спосіб введення, схему введення та інші фактори, відомі практикуючим лікарям. Антитіло не обов'язково повинне, але можливо приготоване з одним або більше ніж одним агентом, що використовується в цей час для попередження або лікування розладу, що розглядається. Ефективна кількість таких інших агентів залежить від кількості антитіла, присутнього в препараті, типу розладу або лікування та інших факторів, що обговорювалися вище. Вони звичайно використовуються в таких самих дозуваннях і з використанням таких самих шляхів введення, які описані в даному документі, або приблизно від 1 до 99 % від дозувань, описаних в даному документі, або в будь-якому дозуванні і за допомогою будь-якого шляху, який емпірично/клінічно визначений як придатний.

Для попередження або лікування захворювання придатне дозування антитіла за винаходом (при застосуванні його одного або в комбінації з одним або більше ніж одним другим додатковим терапевтичним агентом) буде залежати від типу захворювання, що підлягає лікуванню, типу антитіла, тяжкості і протікання захворювання, того, чи вводиться антитіло для попереджувальних або терапевтичних цілей, попередньої терапії, клінічної історії і відповіді на антитіло пацієнта, і рішення лікуючого лікаря. Антитіло придатним чином вводиться пацієнту за один раз або протягом серії обробок. Залежно від типу і тяжкості захворювання, вихідним дозуванням-кандидатом для введення пацієнту може бути приблизно від 1 мкг/кг до 15 мг/кг (наприклад, 0,5 мкг/кг - 10 мг/кг) антитіла, незалежно від того, наприклад, чи здійснюється воно одним або більше ніж одним роздільним введенням або за допомогою безперервної інфузії. Одне типове добове дозування може варіювати від приблизно 1 мкг/кг до 100 мг/кг або більше, залежно від факторів, зазначених вище. Для повторних введень протягом декількох діб або довше, залежно від стану, лікування звичайно підтримувалося б до бажаної появи приглушення симптомів захворювання. Одне типове дозування антитіла знаходилося б в інтервалі від приблизно 0,05 мкг/кг до приблизно 10 мг/кг. Таким чином, пацієнту могла б вводиться одна або більше ніж одна доза приблизно 0,5 мкг/кг, 2,0 мкг/кг, 4,0 мкг/кг або 10 мг/кг (або будь-яка їх комбінація). Такі дози можуть вводитися періодично, наприклад, кожний тиждень або кожні три тижні (наприклад, таким чином, що пацієнт одержує від приблизно двох до приблизно двадцяти,

або, наприклад, приблизно шість доз антитіла). Може вводиться вихідна більш висока завантажувальна доза, з наступними одною або більше ніж одною меншими дозами. Типова схема дозування включає введення вихідної завантажувальної дози приблизно 4 мг/кг, з наступною щотижневою підтримуючою дозою приблизно 2 мг/кг антитіла. Однак можуть бути корисними інші схеми дозування. Прогрес даної терапії легко відстежується традиційними методиками і аналізами.

Зрозуміло, що будь-які з наведених вище препаратів або терапевтичних способів можуть здійснюватися з використанням імунокон'югата за винаходом замість або крім антитіла до PD1.

Зрозуміло, що будь-які з наведених вище препаратів або терапевтичних способів можуть здійснюватися з використанням імунокон'югата за винаходом замість або крім антитіла до PD1.

## II. Вироби

В іншому аспекті винаходу запропонований виріб, що містить речовини, корисні для лікування, попередження і/або діагностики описаних вище розладів. Виріб містить контейнер та етикетку або аркуш-вкладку в упаковці на або асоційовані з контейнером. Придатні контейнери включають, наприклад, пляшки, флакони, шприці, мішки з в.в. (внутрішньовенний) розчином тощо. Контейнери можуть бути зроблені з цілої низки матеріалів, таких як скло або пластмаса. Контейнер містить композицію, яка сама або в комбінації з іншою композицією є ефективною для лікування, попередження і/або діагностики стану, і може мати стерильний порт доступу (наприклад, контейнер може являти собою мішок для внутрішньовенного розчину або флакон, що має пробку, яка піддається проколюванню підшкірною ін'єкційною голкою). Щонайменше один активний агент в композиції являє собою антитіло за винаходом. На етикетці або аркуші-вкладці в упаковці вказано те, що композиція використовується для лікування вибраного стану. Крім того, виріб може містити (а) перший контейнер з композицією, яка міститься в ньому, де дана композиція містить антитіло за винаходом; і (б) другий контейнер з композицією, яка міститься в ньому, де дана композиція містить додатковий цитотоксичний або інший терапевтичний агент. Виріб у даному втіленні винаходу може додатково містити аркуш-вкладку в упаковці, на якому вказано те, що композиції можуть бути використані для лікування конкретного стану. Альтернативно або додатково, виріб може додатково містити другий (або третій) контейнер, який містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як бактеріостатична вода для ін'єкції (BWFI), фосфатно-сольовий буферний розчин, розчин Рінгера і розчин декстрази. Він може додатково включати інші матеріали, бажані з комерційної або користувацької точки зору, що включають інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки та шприці.

Зрозуміло, що будь-який з наведених вище виробів може включати імунокон'югат за винаходом замість або крім антитіла до PD1.

Опис амінокислотних послідовностей

SEQ ID NO: 1 HVR-H1 важкого ланцюга, PD1-0103

SEQ ID NO: 2 HVR-H2 важкого ланцюга, PD1-0103

SEQ ID NO: 3 HVR-H3 важкого ланцюга, PD1-0103

SEQ ID NO: 4 HVR-L1 легкого ланцюга, PD1-0103

SEQ ID NO: 5 HVR-L2 легкого ланцюга, PD1-0103

SEQ ID NO: 6 HVR-L3 легкого ланцюга, PD1-0103

SEQ ID NO: 7 варіабельний домен VH важкого ланцюга, PD1-0103

SEQ ID NO: 8 варіабельний домен VL легкого ланцюга, PD1-0103

SEQ ID NO: 9 HVR-H1 важкого ланцюга, PD1-0098

SEQ ID NO: 10 HVR-H2 важкого ланцюга, PD1-0098

SEQ ID NO: 11 HVR-H3 важкого ланцюга, PD1-0098

SEQ ID NO: 12 HVR-L1 легкого ланцюга, PD1-0098

SEQ ID NO: 13 HVR-L2 легкого ланцюга, PD1-0098

SEQ ID NO: 14 HVR-L3 легкого ланцюга, PD1-0098

SEQ ID NO: 15 варіабельний домен VH важкого ланцюга, PD1-0098

SEQ ID NO: 16 варіабельний домен VL легкого ланцюга, PD1-0098

SEQ ID NO: 17 HVR-H1 важкого ланцюга, PD1-0050

SEQ ID NO: 18 HVR-H2 важкого ланцюга, PD1-0050

SEQ ID NO: 19 HVR-H3 важкого ланцюга, PD1-0050

SEQ ID NO: 20 HVR-L1 легкого ланцюга, PD1-0050

SEQ ID NO: 21 HVR-L2 легкого ланцюга, PD1-0050

SEQ ID NO: 22 HVR-L3 легкого ланцюга, PD1-0050

SEQ ID NO: 23 варіабельний домен VH важкого ланцюга, PD1-0050

SEQ ID NO: 24 варіабельний домен VL легкого ланцюга, PD1-0050

SEQ ID NO: 25 HVR-H1 важкого ланцюга, PD1-0069

SEQ ID NO: 26 HVR-H2 важкого ланцюга, PD1-0069  
 SEQ ID NO: 27 HVR-H3 важкого ланцюга, PD1-0069  
 SEQ ID NO: 28 HVR-L1 легкого ланцюга, PD1-0069  
 SEQ ID NO: 29 HVR-L2 легкого ланцюга, PD1-0069  
 5 SEQ ID NO: 30 HVR-L3 легкого ланцюга, PD1-0069  
 SEQ ID NO: 31 варіабельний домен VH важкого ланцюга, PD1-0069  
 SEQ ID NO: 32 варіабельний домен VL легкого ланцюга, PD1-0069  
 SEQ ID NO: 33 HVR-H1 важкого ланцюга, PD1-0073  
 SEQ ID NO: 34 HVR-H2 важкого ланцюга, PD1-0073  
 10 SEQ ID NO: 35 HVR-H3 важкого ланцюга, PD1-0073  
 SEQ ID NO: 36 HVR-L1 легкого ланцюга, PD1-0073  
 SEQ ID NO: 37 HVR-L2 легкого ланцюга, PD1-0073  
 SEQ ID NO: 38 HVR-L3 легкого ланцюга, PD1-0073  
 SEQ ID NO: 39 варіабельний домен VH важкого ланцюга, PD1-0073  
 15 SEQ ID NO: 40 варіабельний домен VL легкого ланцюга, PD1-0073  
 SEQ ID NO: 41 HVR-H1 важкого ланцюга, PD1-0078  
 SEQ ID NO: 42 HVR-H2 важкого ланцюга, PD1-0078  
 SEQ ID NO: 43 HVR-H3 важкого ланцюга, PD1-0078  
 SEQ ID NO: 44 HVR-L1 легкого ланцюга, PD1-0078  
 20 SEQ ID NO: 45 HVR-L2 легкого ланцюга, PD1-0078  
 SEQ ID NO: 46 HVR-L3 легкого ланцюга, PD1-0078  
 SEQ ID NO: 47 варіабельний домен VH важкого ланцюга, PD1-0078  
 SEQ ID NO: 48 варіабельний домен VL легкого ланцюга, PD1-0078  
 SEQ ID NO: 49 HVR-H1 важкого ланцюга, PD1-0102  
 25 SEQ ID NO: 50 HVR-H2 важкого ланцюга, PD1-0102  
 SEQ ID NO: 51 HVR-H3 важкого ланцюга, PD1-0102  
 SEQ ID NO: 52 HVR-L1 легкого ланцюга, PD1-0102  
 SEQ ID NO: 53 HVR-L2 легкого ланцюга, PD1-0102  
 SEQ ID NO: 54 HVR-L3 легкого ланцюга, PD1-0102  
 30 SEQ ID NO: 55 варіабельний домен VH важкого ланцюга, PD1-0102  
 SEQ ID NO: 56 варіабельний домен VL легкого ланцюга, PD1-0102  
 SEQ ID NO: 57 гуманізований варіант - варіабельний домен VH важкого ланцюга PD1-0103\_01  
 SEQ ID NO: 58 гуманізований варіант - варіабельний домен VL легкого ланцюга PD1-0103\_01  
 35 SEQ ID NO: 59 гуманізований варіант - варіабельний домен VL легкого ланцюга PD1-0103\_02  
 SEQ ID NO: 60 гуманізований варіант - варіабельний домен VL легкого ланцюга PD1-0103\_03  
 40 SEQ ID NO: 61 гуманізований варіант - варіабельний домен VL легкого ланцюга PD1-0103\_04  
 SEQ ID NO: 62 константна ділянка людського легкого ланцюга каппа  
 SEQ ID NO: 63 константна ділянка людського легкого ланцюга лямбда  
 SEQ ID NO: 64 константна ділянка людського важкого ланцюга, що походить з IgG1  
 45 SEQ ID NO: 65 константна ділянка людського важкого ланцюга, що походить з IgG1 з мутаціями L234A і L235A  
 SEQ ID NO: 66 константна ділянка людського важкого ланцюга, що походить з IgG1 з мутаціями L234A, L235A і P329G  
 SEQ ID NO: 67 константна ділянка людського важкого ланцюга, що походить з IgG4  
 50 SEQ ID NO: 68 типова послідовність людського PD1 (без сигнальної послідовності)  
 SEQ ID NO: 69 позаклітинний домен людського PD1 (ECD)  
 SEQ ID NO: 70 типова послідовність людського PD1 (що включає сигнальну послідовність)  
 SEQ ID NO: 71: мінімальна HVR1 PD1-0103 і гуманізованого варіанта PD1-0103-PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 і PD1-0103-0315  
 55 SEQ ID NO: 72: мінімальна HVR2 PD1-0103 і гуманізованого варіанта PD1-0103-PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 і PD1-0103-0315  
 SEQ ID NO: 73: мінімальна HVR3 PD1-0103 і гуманізованого варіанта PD1-0103-PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 і PD1-0103-0315  
 SEQ ID NO: 74: мінімальна LVR1 PD1-0103 і гуманізованого варіанта PD1-0103-PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 і PD1-0103-0315  
 60



SEQ ID NO: 75: мінімальна LVR2 PD1-0103 і гуманізованого варіанта PD1-0103-PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 і PD1-0103-0315

SEQ ID NO: 76: мінімальна LVR3 PD1-0103 і гуманізованого варіанта PD1-0103-PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 і PD1-0103-0315

5 SEQ ID NO: 77: фрагмент FR-H3, який містить амінокислотну послідовність RDN в положеннях 71, 72, 73 згідно з нумерацією Kabat

Далі перелічені наступні амінокислотні послідовності доменів VH і VL, що включають відмічені HVR (HVR показані жирними підкресленими літерами), антитіло до PD1 PD1-0016 (і його гуманізованих версій PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 і PD1-0103-0315),  
10 PD1-0098, PD1-0050, PD1-0069, PD1-0073, PD1-0078 і PD1-0102:

Антитіло до PD1 PD1-0103:

VH PD1-0103:

EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS**GFSFSSY**TMSWVRQTPEKRLDWVATISG**GGR**DIYYPDSV  
KGRFTISRDNKNTLYLEMSSLMS EDTALYYCVLL**TGRVYFALD**SWGQGTSTVTSS

15 VL PD1-0103:

KIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRAS**ESVDTSDNSF**IHWYQQRPQGQSPKLLIY**RSS**TLESGVPARF  
SGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQ**NYDVPW**TFGGQGTKEIK

Версії гуманізованого антитіла до PD1 PD1-0103: PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 і PD1-0103-0315:

20 VH PD1-0103-0312=VH PD1-0103-0313=VH PD1-0103-0314=VH PD1-0103-0315:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFSFSSY**TMSWVRQAPGKGLEWVATISG**GGR**DIYYPDS  
VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCVLL**TGRVYFALD**SWGQGTSTVTSS

VL PD1-0103-0312:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKAS**ESVDTSDNSF**IHWYQQKPGQSPKLLIY**RSS**TLESGVPDRF  
25 SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ**NYDVPW**TFGGQGTKEIK

VL PD1-0103-0313:

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRAS**ESVDTSDNSF**IHWYQQRPQGQSPRLIY**RSS**TLESGVPDR  
FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQ**NYDVPW**TFGGQGTKEIK

VL PD1-0103-0314:

30 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS**ESVDTSDNSF**IHWYQQKPGQSPRLIY**RSS**TLESGIPARF  
SGSGSGTDFTLTISLPEPDAVYYCQQ**NYDVPW**TFGGQGTKEIK

VL PD1-0103-0315:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS**ESVDTSDNSF**IHWYQQKPGQSPRLIY**RSS**TLESGIPARF  
SGSGSGTDFTLTISLPEPDAVYYCQQ**NYDVPW**TFGGQGTKEIK

35 Антитіло до PD1 PD1-0098:

VH PD1-0098:

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVT**GYSITSDY**AWNWIRQFPGDKLEWLG YITY**YSG**FTNYPNPSLK  
SRISIRDTSKNQFFLQLNSVATEDTATYYCARW**HGSAPWYFD**YWGRGTTLTSS

VL PD1-0098:

40 DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS**SQNIVHSDGNTY**LEWYLQKPGQSPNLLIY**KVS**RRFSGVDP  
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYYCFQ**GSHFPL**TFGAGTKLEIK

VH: 0050

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVT**GYSITSDY**AWNWIRQFPGNKLEWMGYITY**YTGR**TSYNPSL  
KSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARE**MDYYGSTLD**YWGQGTTLTSS

45 VL: 0050

KIVLTQSPASLAVSLRQRATISCRAS**ESVDRYGN**SFIHWYQQKPGQPPKVLIIY**RAS**NLESGFPARF  
SGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQ**NNEDPY**TFGSGTKLEIK

VH: 0069

50 QVQLQQSGPELVPRPGVSVKISCKGSG**GYTFTDY**AMHWVKQSHARTLEWIGVISTY**YSG**DTNYPNQKF  
KDKATMTVDKSSSTAYLELARMTSEDSAIYYCARL**GITTGFA**YWGQGTTLTSSA

VL: 0069

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS**SKGVSTSSYS**FMHWYQQKPRQPPKLLIKY**YAS**YLESGVPAR  
FSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCHH**SREFPW**TFGGQGTKEIK

VH: 0073

55 EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS**GFTFSNY**GMSWIRQTPEKGLEWVATISG**GGR**DTYYPDSV  
KGRFTISRDNVKNLYLQMSSLRSEDTAFYYCASY**YYGIDY**YWGQGTSTVTSS

VL: 0073

DIVMTQPHKFMSTSVGDRVRITCKA**SQDVTTA**VAWYQQKPGQSPKLLIY**WAS**TRHTGVPDRFTG  
SGSGTEFTLTISVQAEDLALYYCQQ**HYSIPW**TFGGQGTKEIK

60 VH: 0078

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSTWMHWWKQRPQGQGLEWIGAIIDPSSDSYTTYNQK  
FKGKATLTVDTSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRS~~PF~~DYWGQGTTLTVSS

VL: 0078

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASRYRTGVPDRFTG  
5 SGSGTDFTFAISSVQAEDLAVYYCQQHYSH~~PF~~TFGSGTKLEIK

VH: 0102

DVQLQESGPDLVKPSQSLSTCTVTGYSITSGYSWHWIRQFPGNKLEWMGFIHSSGDTNYPNSL  
KSRISFTRDTSKNQFFLQLSSLTDEDTATYYCATYRNWYFDVWGAGTTVTVSS

VL: 0102

10 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMRCKSSQSL~~LN~~SGTQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV  
PNRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLSVYYCQSDYTFPLTFGGGKLELK

Далі перелічені конкретні втілення винаходу:

1. Виділене антитіло, яке зв'язується з людським PD1, де дане антитіло зв'язується з  
(центральним) цукровим ланцюгом на Asn58 глікозильованого людського PD1 SEQ ID NO: 70,  
15 який є глікозильованим на Asn58.

2. Антитіло за п. 1, де дане антитіло додатково зв'язується з одною або більше ніж одною  
амінокислотою в положеннях 60-64, 68, 78-84, 126-134 людського PD1.

3. Антитіло за будь-яким з пп. 1 або 2, де дане антитіло зв'язується його важким ланцюгом з  
цукровим ланцюгом на Asn58.

20 4. Антитіло за будь-яким з пп. 2-3, де дане антитіло зв'язується з одною або більше ніж  
одною амінокислотою в положеннях 61, 62, 64, 83, 126, 128, 132, 134 людського PD1.

5. Антитіло за будь-яким з пп. 2-3, де дане антитіло зв'язується з амінокислотами положень  
61, 62, 64, 83, 126, 128, 132, 134 людського PD1.

25 6. Антитіло за будь-яким з пп. 2-3, де дане антитіло зв'язується з амінокислотами положень  
60, 61, 62, 63, 64, 68, 78, 82, 83, 84, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134 людського PD1.

7. Антитіло за будь-яким з пп. 1-6, де дане антитіло зв'язується з людським PD1, на якому  
антитіло зв'язується з першим і другим GINac, FUC, BMA і MAN в межах (центрального)  
цукрового ланцюга Asn58 глікозильованого людського PD1 SEQ ID NO: 70, який є  
глікозильованим на Asn58.

30 8. Антитіло за будь-яким з пп. 1-7, де дане антитіло демонструє знижене зв'язування з  
людським PD1 SEQ ID NO: 70, який не є глікозильованим на Asn58, у порівнянні із зв'язуванням  
з людським PD1, який є глікозильованим на Asn58.

9. Виділене антитіло, яке зв'язується з людським PD1, де дане антитіло містить:

35 (а) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:71; (б) HVR-H2, яка містить  
амінокислотну послідовність SEQ ID NO:72; (в) HVR-H3, яка містить амінокислотну  
послідовність SEQ ID NO:73; (г) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:74;  
(д) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:75; (е) HVR-L3, яка містить  
амінокислотну послідовність SEQ ID NO:76, і (ж) FR-H3, яка містить амінокислотну послідовність  
SEQ ID NO:77 (RDN) в положеннях 71, 72 і 73 згідно з нумерацією Kabat.

40 10. Виділене антитіло, яке зв'язується з людським PD1 за п. 9, де дане антитіло  
А)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:7 і послідовність VL SEQ ID NO:8;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

або Б)

45 i) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:58;

ii) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:59;

iii) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:60;

iv) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:61.

Далі перелічені конкретні втілення винаходу:

50 1. Виділене антитіло, яке зв'язується з людським PD1, де дане антитіло містить:

А) (а) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1; (б) HVR-H2, яка  
містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2; (в) HVR-H3, яка містить амінокислотну  
послідовність SEQ ID NO:3; (г) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4;  
(д) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5; і (е) HVR-L3, яка містить  
55 амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6; або

Б) (а) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:9; (б) HVR-H2, яка  
містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10; (в) HVR-H3, яка містить амінокислотну  
послідовність SEQ ID NO:11; (г) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12;  
(д) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13; і (е) HVR-L3, яка містить  
60 амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14; або



амінокислотну послідовність SEQ ID NO:45, і (iii) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:46; або

Ж) (а) домен VH, який містить (i) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:49, (ii) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:50, і (iii) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:51, і (б) домен VL, який містить (i) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:52, (ii) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:53, і (iii) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:54.

3. Виділене антитіло, яке зв'язується з людським PD1, де дане антитіло

А)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:7 і послідовність VL SEQ ID NO:8;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

або Б)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:58;

ii) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:59;

iii) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:60;

iv) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:61;

або В)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:15 і послідовність VL SEQ ID NO:16;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

або Г)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:23 і послідовність VL SEQ ID NO:24;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

або Д)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:31 і послідовність VL SEQ ID NO:32;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

або Е)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:39 і послідовність VL SEQ ID NO:40;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

або Ж)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:47 і послідовність VL SEQ ID NO:48;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);

або З)

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:55 і послідовність VL SEQ ID NO:56;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i).

4. Виділене антитіло, яке зв'язується з людським PD1, де дане антитіло

i) містить послідовність VH SEQ ID NO:7 і послідовність VL SEQ ID NO:8;

ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i).

5. Виділене антитіло, яке зв'язується з людським PD1, де дане антитіло містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:58.

6. Виділене антитіло, яке зв'язується з людським PD1, де дане антитіло містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:59.

7. Виділене антитіло, яке зв'язується з людським PD1, де дане антитіло містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:60.

8. Виділене антитіло, яке зв'язується з людським PD1, де дане антитіло містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:61.

9. Антитіло до PD1 за будь-яким з втілень 1-8,

де дане антитіло характеризується незалежно однією або більше ніж однією з наступних властивостей: антитіло до PD1

i) конкурує за зв'язування з PD-1 з антитілом до PD1, яке містить VH з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:7 і VL з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:8, i/або

ii) зв'язується з PD-1 людини і яванського макака; i/або

iii) посилює секрецію інтерферону-гамма (IFN-гамма) алогенними стимульованими Т-клітинами на 85 % або більше при концентрації антитіла 10 мкг/мл; i/або

iv) посилює секрецію фактора некрозу пухлин альфа (TNF альфа) алогенними стимульованими Т-клітинами на 200 % або більше при концентрації антитіла 10 мкг/мл.

10. Виділене антитіло, яке зв'язується з PD1, де дане антитіло посилює секрецію фактора некрозу пухлин альфа (TNF альфа) алогенними стимульованими Т-клітинами на 200 % або більше (в одному переважному втіленні на 250 % або більше) при концентрації антитіла 10 мкг/мл в аналізі реакції змішаної культури лімфоцитів (MLR).

11. Виділене антитіло, яке зв'язується з PD1, де дане антитіло посилює секрецію інтерферону-гамма (IFN-гамма) алогенними стимульованими Т-клітинами на 85 % або більше (в одному переважному втіленні на 90 % або більше, в одному переважному втіленні на 95 % або більше) при концентрації антитіла 10 мкг/мл в аналізі реакції змішаної культури лімфоцитів (MLR).

12. Виділене антитіло, яке зв'язується з людським PD1, де дане антитіло:

i) конкурує за зв'язування з PD-1 з антитілом до PD1, яке містить VH з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:7 і VL з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:8, і/або

ii) зв'язується з PD-1 людини і яванського макака; і

iii) посилює секрецію інтерферону-гамма (IFN-гамма) алогенними стимульованими Т-клітинами на 85 % або більше при концентрації антитіла 10 мкг/мл; і/або

iv) посилює секрецію фактора некрозу пухлин альфа (TNF альфа) алогенними стимульованими Т-клітинами на 200 % або більше при концентрації антитіла 10 мкг/мл.

13. Антитіло за будь-яким з втілень 1-12, яке являє собою моноклональне антитіло.

14. Антитіло за будь-яким з втілень 1-13, яке являє собою людське, гуманізоване або химерне антитіло.

15. Антитіло за будь-яким з втілень 1-14, яке являє собою фрагмент антитіла, який зв'язується з PD1.

16. Антитіло за будь-яким з втілень 1-15, яке являє собою повнорозмірне антитіло IgG1.

17. Антитіло за будь-яким з втілень 1-16, яке являє собою повнорозмірне антитіло IgG1 з мутаціями L234A, L235A і P329G (нумерація згідно з індексом EU за Kabat).

18. Виділена нуклеїнова кислота, кодує антитіло за будь-яким з втілень 1-17.

19. Клітина-хазяїн, яка містить нуклеїнову кислоту за втіленням 18.

20. Спосіб одержання антитіла, який включає культивування клітини-хазяїна за втіленням 19 таким чином, що продукується антитіло.

21. Спосіб за втіленням 20, який додатково включає виділення антитіла з клітини-хазяїна.

22. Фармацевтичний препарат, який містить антитіло за будь-яким з втілень 1-17 і фармацевтично прийнятний носій.

23. Антитіло за будь-яким з втілень 1-17 для застосування як лікарський засіб.

24. Антитіло за будь-яким з втілень 1-17 для застосування в лікуванні раку.

25. Застосування антитіла за будь-яким з втілень 1-17 в приготуванні лікарського засобу.

26. Застосування за втіленням 25, де лікарський засіб призначений для лікування раку.

27. Спосіб лікування індивіда, який має рак, що включає введення даному індивіду ефективного кількості антитіла за втіленням 1.

### III. ПРИКЛАДИ

Наступне являє собою приклади способів та композицій за винаходом. Зрозуміло, що можна практикувати різні інші втілення, беручи до уваги загальний опис, наведений вище.

Хоча вищевикладений винахід і був описаний в деяких подробицях за допомогою ілюстрації і прикладу для цілей точності розуміння, дані описи та приклади не потрібно тлумачити як такі, що обмежують обсяг винаходу. Розкриття всієї патентної та наукової літератури, процитованої в даному документі, прямо включені у всій їх повноті за допомогою посилання.

Приклад 1:

Одержання антитіл до PD-1

Імунізація мишей

Мишей NMRI імунізували генетично з використанням плазмідного експресійного вектора, кодує повнорозмірний людський PD-1, за допомогою внутрішньошкірного введення 100 мкг ДНК вектора (плазмідна 15300\_hPD1-fl), з наступною електропорацією (2 квадратних імпульси 1000 В/см, тривалість 0,1 мс, інтервал 0,125 с; з наступними 4 квадратними імпульсами 287,5 В/см, тривалість 10 мс, інтервал 0,125 с. Миші одержували 6 послідовних імунізацій на добу 0, 14, 28, 42, 56, 70 і 84. Кров відбирали на добу 36, 78 і 92, і одержували сироватку, яку використовували для визначення титру за допомогою ELISA (див. нижче). Тварин з найвищими титрами відбирали для повторної імунізації на добу 96 за допомогою внутрішньовенної ін'єкції 50 мкг рекомбінантної химери людського PD1 з людським Fc, і моноклональні антитіла виділяли методикою гібридом за допомогою злиття спленоцитів з лінією мієломних клітин через 3 доби після повторної імунізації.

Визначення сироваткових титрів (ELISA)

Химеру людського рекомбінантного PD1 з людським Fc іммобілізували на 96-ямковому планшеті NUNC MaxiSorp в концентрації 0,3 мкг/мл, 100 мкл/ямку в PBS (фосфатно-сольовий буферний розчин), з наступними: блокуванням планшета 2 % кротейном з в PBS, 200 мкл/ямку; нанесенням серійних розведень антисироватки в подвійних повтореннях в 0,5 % кротейні з в

PBS, 100 мкл/ямку; виявленням антитілом кози проти мишиного антитіла, кон'югованим з HRP (пероксидаза хрину) (Jackson ImmunoResearch/Dianova 115-036-071; 1/16 000). Для всіх етапів планшети інкубували протягом 1 години при 37 °C. Між всіма етапами планшети 3 рази промивали 0,05 % Tween 20 в PBS. Сигнал проявляли додаванням розчинного субстрату POD (пероксидаза) BM Blue (Roche), 100 мкл/ямку; і зупиняли розвиток реакції додаванням 1 М HCl, 100 мкл/ямку. Поглинання зчитували при 450 нм у порівнянні з 690 нм як контроль. Титр визначали як розведення антисироватки, що призводить до напівмаксимального сигналу.

#### Приклад 2:

Характеризація антитіл до PD1

Зв'язування антитіл до PD1 с людським PD1

ELISA на hu PD1 (людський PD1)

Планшети Nunc Maxisorp, покриття стрептавідином (MicroCoat #11974998001) покривали 25 мкл/ямку біотинільованого PD1-ECD-AviHis та інкубували при 4 °C протягом ночі. Після промивання (3×90 мкл/ямку буфером PBST) додавали 25 мкл зразків антитіла до PD1 або контрольних антитіл (людське антитіло до PD1; Roche / мишине антитіло до PD1; Biolegend; кат.: 329912) та інкубували 1 годину при RT (кімнатна температура). Після промивання (3×90 мкл/ямку буфером PBST) додавали 25 мкл/ямку антитіла кози проти H+L (важкого і легкого ланцюга) антитіла людини, кон'югованого з POD (JIR, JIR109-036-088) / антитіла вівці проти мишиного антитіла, кон'югованого з POD (GE Healthcare; NA9310), в розведенні 1:2000/1:1000 та інкубували протягом 1 години при RT на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/ямку буфером PBST) додавали 25 мкл/ямку субстрату TMB (тетраметилбензидин) (Roche, каталожний № 11835033001) та інкубували до ОП 2-3. Вимірювання відбувалося при 370/492 нм.

Результати ELISA перелічуються у вигляді значень EC50 (напівмаксимальна ефективна концентрація) [нг/мл] в узагальнюючих Таблицях 2 і 3, наведених нижче.

Клітинний ELISA на PD1

Прикріплену лінію клітин CHO-K1, стабільно трансфіковану плазмідом 15311\_hPD1-fl\_rUC\_Neo, кодууючою повнорозмірний людський PD1, і піддану селекції з G418 (маркер стійкості до неоміцину на плазміді), засівали в концентрації 0,01×10E6 клітин/ямку в 384-ямкові плоскодонні планшети і вирощували протягом ночі.

На наступну добу додавали 25 мкл/ямку зразка PD1 або людського контрольного антитіла до PD1 (Roche)/мишиного контрольного антитіла до PD1 (Biolegend; кат.: 329912) та інкубували протягом 2 годин при 4 °C (для того, щоб запобігти інтерналізації). Після ретельного промивання (1×90 мкл/ямку PBST) клітини фіксували додаванням 30 мкл/ямку 0,05 % глутаральдегіду (Sigma, кат. №: G5882, 25 %), розведеного в 1×буфері PBS, та інкубували протягом 10 хв при RT. Після промивання (3×90 мкл/ямку PBST) додавали 25 мкл/ямку вторинного антитіла для виявлення: антитіла кози проти H+L антитіла людини, кон'югованого з POD (JIR, JIR109-036-088) / антитіла вівці проти мишиного антитіла, кон'югованого з POD (GE NA9310), з наступною 1 годинною інкубацією при RT на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/ямку PBST) додавали 25 мкл/ямку розчину субстрату TMB (Roche 11835033001) та інкубували до ОП 1,0-2,0. Планшети вимірювали при 370/492 нм.

Результати клітинного ELISA перелічені у вигляді значень "EC50 CHO-PD1" [нг/мл] в узагальнюючій Таблиці 3, наведеній нижче.

ELISA на PD1 яванського макака

Планшети Nunc Maxisorp, покриття стрептавідином (MicroCoat #11974998001) покривали 25 мкл/ямку біотинільованого супоPD1-ECD-біотину та інкубували при 4 °C протягом ночі. Після промивання (3×90 мкл/ямку буфером PBST) додавали 25 мкл зразків антитіла до PD1 або контрольних антитіл (людське антитіло до PD1; Roche) та інкубували 1 годину при RT на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/ямку буфером PBST) додавали 25 мкл/ямку антитіла кози проти H+L антитіла людини, кон'югованого з POD (JIR, JIR109-036-088), в розведенні 1:1000 та інкубували при RT протягом 1 години на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/ямку буфером PBST) додавали 25 мкл/ямку субстрату TMB (Roche, 11835033001) та інкубували до ОП 2-3. Вимірювання відбувалося при 370/492 нм.

Результати ELISA перелічуються у вигляді значень EC50 [нг/мл] в узагальнюючих Таблицях 2 і 3, наведених нижче.

Аналіз заміни ліганду 1 PD

Планшети Nunc Maxisorp, покриття стрептавідином (MicroCoat #11974998001) покривали 25 мкл/ямку біотинільованого PD1-ECD-AviHis та інкубували при 4 °C протягом ночі. Після промивання (3×90 мкл/ямку буфером PBST) додавали 25 мкл зразків антитіла до PD1 або контрольних антитіл (мишине антитіло до PD1; Biolegend; кат.:329912) та інкубували 1 годину при RT на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/ямку буфером PBST) додавали 25 мкл/ямку

PD-L1 (химера рекомбінантного людського B7-H1/PD-L1 Fc; 156-B7, R&D) та інкубували 1 годину при RT на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/ямку буфером PBST) додавали 25 мкл/ямку антитіла кози проти H+L антитіла людини, кон'югованого з POD (JIR, 109-036-088), в розведенні 1:1000 та інкубували при RT протягом 1 години на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/ямку буфером PBST) додавали 25 мкл/ямку субстрату TMB (Roche, 11835033001) та інкубували до ОП 2-3. Вимірювання відбувалося при 370/492 нм.

Результати ELISA перелічуються у вигляді значень IC50 (напівмаксимальна інгібуєча концентрація) [нг/мл] в узагальнюючій Таблиці 2, наведеній нижче.

Аналіз заміни ліганду 2 PD

Планшети Nunc Maxisorp, покриття стрептавідином (MicroCoat #11974998001) покривали 25 мкл/ямку біотинільованого PD1-ECD-AviHis та інкубували при 4 °C протягом ночі. Після промивання (3×90 мкл/ямку буфером PBST) додавали 25 мкл зразків антитіла до PD1 або контрольного антитіла (мишине антитіло до huPD1; Roche) та інкубували 1 годину при RT на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/ямку буфером PBST) додавали 25 мкл/ямку PD-L2 (химера рекомбінантного людського B7-DC/PD-L2 Fc; 1224-PL-100, R&D) та інкубували 1 годину при RT на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/ямку буфером PBST) додавали 25 мкл/ямку антитіла кози проти H+L антитіла людини, кон'югованого з POD (JIR, 109-036-088), в розведенні 1:2000 та інкубували при RT протягом 1 години на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/ямку буфером PBST) додавали 25 мкл/ямку субстрату TMB (Roche, 11835033001) та інкубували до ОП 2-3. Вимірювання відбувалося при 370/492 нм.

Результати ELISA перелічуються у вигляді значень IC50 [нг/мл] в узагальнюючій Таблиці 2, наведеній нижче.

ELISA картування епітопів/аналіз конкурентного зв'язування

Планшети Nunc Maxisorp (Nunc #464718) покривали 25 мкл/ямку захоплюючого антитіла (антитіло кози проти мишиного IgG; JIR; 115-006-071) та інкубували протягом 1 години при RT на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/ямку буфером PBST) планшети блокували протягом 1 години буфером PBS, який містить 2 % BSA (бичачий сироватковий альбумін) на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/ямку буфером PBST) додавали 25 мкл зразків мишиного антитіла до PD1 та інкубували 1 годину при RT на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/ямку буфером PBST) захоплює антитіло блокували 30 мкл/ямку мишиного IgG (JIR; 015-000-003) протягом 1 години при RT на шейкері. В той самий час біотинільований PD1-ECD-AviHis передінкубували з другим зразком антитіла протягом 1 години при RT на шейкері. Після промивання планшета для аналізу (3×90 мкл/ямку буфером PBST) суміш антитіла з PD1 переносили на планшет для аналізу та інкубували при RT протягом 1 години на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/ямку буфером PBST) додавали 25 мкл/ямку стрептавідин-POD (Roche, #11089153001) в розведенні 1:4000 та інкубували при RT протягом 1 години на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/ямку буфером PBST) додавали 25 мкл/ямку субстрату TMB (Roche, #11089153001) та інкубували до ОП 1,5-2,5. Вимірювання відбувалося при 370/492 нм. Групи епітопів визначали ієрархічною кластеризацією відносно контрольних антитіл.

Таблиця 2

Зв'язування, інгібування PD-L1 і групи ділянок епітопів типових антитіл (ELISA)

Антитіло	ELISA huPD1 EC50 [нг/мл]	ELISA суPD1 EC50 [нг/мл]	ELISA інгібування PD- L1 IC50 [нг/мл]	ELISA інгібування PD- L2 IC50 [нг/мл]	Група ділянки епітопа, визначена конкурентним аналізом
PD1-0050	17,9	9,8	128	34	1
PD1-0069	45,7	22,7	225	89	6
PD1-0073	15,1	8,3	124	65	5
PD1-0078	26,3	22,4	x	86	2
PD1-0098	50,8	54,6	174	45	5
PD1-0102	34,2	52,7	>35,5 мкг/мл	140	4
PD1-0103	33,7	36,9	182	51	5

Таблиця 3

Біохімічне зв'язування і зв'язування з клітинами гуманізованих антитіл до PD1, одержаних з батьківського мишиного антитіла PD1-0103 (ELISA)

Гуманізоване антитіло	ELISA huPD1 EC50 [нг/мл]	ELISA cyPD1 EC50 [нг/мл]	ELISA CHO-PD1 EC50 [нг/мл]
PD1-0103-0312	11	8,3	10,1
PD1-0103-0313	15	11	10,8
PD1-0103-0314	11	8,3	7,7
PD1-0103-0315	10	7,9	7,3

Характеризація Біасоре гуманізованих антитіл до PD-1

- 5 Для визначення кінетичних параметрів зв'язування між декількома мишиними зв'язуючими агентами відносно PD1, а також наявними в продажу людськими контрольними зв'язуючими агентами відносно PD1 використовували аналіз на основі поверхневого плазмонного резонансу (SPR). У зв'язку з цим на поверхні сенсорного чипа CM5 (Biacore) іммобілізували антитіло до людського IgG за допомогою амінного зв'язування. Потім захоплювали зразки, і з ними був зв'язаний PD1-ECD. Поверхню сенсорного чипа регенерували після кожного циклу аналізу.
- 10 Зрештою, одержали рівноважну константу і кінетичні константи швидкості за допомогою апроксимації даних до моделі взаємодії Лангмюра 1:1.

- 15 Приблизно 2000 одиниць відповіді (RU) 20 мкг/мл антитіла до IgG людини (GE Healthcare #BR-1008-39) зв'язували на проточних комірках 1 і 2 (як альтернатива: 3 і 4) сенсорного чипа CM5 в Biacore T200 при pH 5,0 з використанням набору для амінного зв'язування, поставленого GE Healthcare.

- Зразком і рухомим буфером були HBS-EP+ (0,01 M HEPES, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05 % об./об. поверхнево-активної речовини P20, pH 7,4). Була встановлена температура проточної комірки 25 °C і температура відсіку для зразка - 12 °C. Система була первинно оброблена рухомим буфером.

- 20 Зразки в концентрації 10 нМ ін'єктували протягом 20 секунд, і вони зв'язувались з другою проточною коміркою. Потім над кожним зразком протягом 120 с ін'єктували повний набір концентрацій людського PD1-ECD (144 нМ, 48 нМ, 16 нМ, 5,33 нМ, 1,78 нМ, 0,59 нМ, 0,20 нМ і 0 нМ), з наступним часом дисоціації 30/300 з і двома 20 с стадіями регенерації 3 M MgCl<sub>2</sub>, з яких остання стадія містила "додаткове промивання після ін'єкції" рухомим буфером.

- 25 Зрештою, дані з подвійним контролем апроксимували до моделі взаємодії Лангмюра 1:1 з використанням програми Biacore T200 Evaluation. Одержані в результаті значення K<sub>D</sub>, k<sub>a</sub> і k<sub>d</sub> показані в Таблиці 4.

Таблиця 4

Кінетичні константи швидкості і рівноважна константа для химерного PD1-0103 і гуманізованих Ab до PD1, визначені за допомогою Біасоре (див. наступну сторінку).

Ліганд	k <sub>a</sub> [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	k <sub>d</sub> [s <sup>-1</sup> ]	K <sub>D</sub> [нМ]
химерне PD1-0103	3,86E+05	3,07E-04	0,8
PD1-0103-0312	1,95E+05	3,45E-04	1,8
PD1-0103-0313	1,60E+05	3,67E-04	2,3
PD1-0103-0314	1,87E+05	2,79E-04	1,5
PD1-0103-0315	1,89E+05	2,91E-04	1,5

- 30 Як показано в Таблиці 4, всі гуманізовані версії химерного PD1-0103 (відносно одержання див. Приклад 6) демонструють кінетичні властивості, аналогічні батьківському антитілу (химерне PD1-0103).

Кінетика

- 35 У систему Біасоре 4000 встановлювали сенсор CM5 серії S, і плями виявлення гідродинамічно адресували згідно з інструкціями виробника.

Поліклональне кроляче антитіло IgG <lgGFCyM>R (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) іммобілізували при 10000 RU на плямах виявлення 1 та 5 в проточних комірках 1, 2, 3 та 4. Зв'язування здійснювали за допомогою хімії EDC/NHS згідно з інструкціями виробника. Решта



плям в проточних комірках служили як контроль. Буфером для зразка був буфер системи, доповнений 1 мг/мл карбоксиметилдекстрана.

В одному втіленні аналіз проходив при 25 °C. В іншому втіленні аналіз проходив при 37 °C. Кожне 50 нМ мишине моноклональне антитіло захоплювали на поверхні сенсора за допомогою 1 хв ін'єкції зі швидкістю 10 мкл/хв. Потім ін'єктували відповідні антигени у серії концентрацій 100 нМ, 2× 33 нМ, 11 нМ, 4 нМ, 1 нМ і 0 нМ в буфері системи зі швидкістю 30 мкл/хв протягом 4 хв фази асоціації. Дисоціацію відстежували протягом ще 4 хв. Систему захоплення регенерували з використанням 3 хв ін'єкції 10 мМ гліцину, рН 1,5, в концентрації 30 мкл/хв. Релевантні кінетичні дані розраховували з використанням програми оцінки Biacore згідно з інструкціями виробника.

#### Картування епітопів

У пристрій Biacore 4000 встановлювали сенсор Biacore CAP, і готували його подібно до рекомендації виробника. Буфером пристрою був HBS-ET (10 мМ HEPES, рН 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0,005 % мас./об. Tween 20). Пристрій працював при 25 °C.

Всі зразки розводили в буфері системи. 35 кДа біотинільований антиген PD1-ECD-AviHis захоплювали при 200 RU на поверхні сенсора CAP за допомогою 1 хв ін'єкції зі швидкістю 30 мкл/хв в проточних комірках 1, 2, 3 і 4 в плямах 1 і 5. Плями 2, 3 і 4 служили як контроль. В іншому втіленні таким самим способом захоплювали 35 кДа біотинільований антиген PD1-ECD-AviHis при 200 RU на сенсорі CAP.

Потім ін'єктували первинне антитіло в концентрації 100 нМ протягом 3 хв зі швидкістю 30 мкл/хв, з наступною ін'єкцією вторинного антитіла в концентрації 100 нМ протягом 3 хв зі швидкістю 30 мкл/хв. Первинне антитіло ін'єктували до повного насичення антигену, присутнього на поверхні. В кінці фаз ін'єкції первинного і вторинного антитіла були встановлені звітні точки "пізні зв'язування" (BL) для відстежування відповіді у вигляді зв'язування відповідних антитіл. Розраховували молярне відношення - частка між відповіддю у вигляді зв'язування вторинного антитіла "BL2" і відповіддю первинного антитіла "BL1". Дане молярне відношення використовували як індикатор доступності антигену для вторинного антитіла, коли даний антиген вже знаходився в комплексі з первинним антитілом.

Комплекси повністю видаляли з поверхні сенсора за допомогою ін'єкції регенеруючого буфера: 2 М гуанідин-HCl, 250 мМ NaON протягом 2 хв зі швидкістю 30 мкл/хв, як рекомендовано виробником, з наступною 1 хв ін'єкцією буфера системи зі швидкістю 30 мкл/хв.

#### Приклад 3

Вплив різних антитіл до PD1 на продукцію цитокінів у реакції змішаної культури лімфоцитів (MLR)

3А) Реакція змішаної культури лімфоцитів (MLR) являє собою аналіз імунних клітин, в якому вимірюється активація лімфоцитів від одного індивіда (донор X) на лімфоцити від іншого індивіда (донор Y). Реакцію змішаної культури лімфоцитів використовували для демонстрації ефекту блокування шляху PD1 на лімфоцитарні ефекторні клітини. Т-клітини в даному аналізі тестували на активацію та секрецію ними IFN-гамма у присутності або за відсутності mAb до PD1.

Для здійснення алогенної MLR одноклітинні периферичної крові (PBMC) щонайменше від чотирьох здорових донорів з невідомим типом HLA виділяли за допомогою центрифугування в градієнті щільності з використанням Leukoser (Greiner Bio One, 227 288). Стисло, гепаринізовані зразки крові розводили в три рази перевищуючим об'ємом PBS, і 25 мл аліквоти розведеної крові нашаровували в 50 мл пробірці Leukoser. Після центрифугування при 800 g протягом 15 хв при кімнатній температурі (без руйнування) фракції, які містять лімфоцити, відбирали, промивали в PBS та використовували безпосередньо в функціональних аналізах або ресуспендували в середовищі, що заморожується, (10 % DMSO (диметилсульфоксид), 90 % FCS (фетальна теляча сироватка)) в концентрації 1,0E+07 клітин/мл і зберігали в рідкому азоті. Проводили індивідуальні 2-сторонні реакції MLR за допомогою змішування PBMC від двох різних донорів у співвідношенні клітини стимулятори/респондери 1:1, і співкультури здійснювали щонайменше в двох повторюваностях у плоскодонних 96-ямкових планшетах протягом 6 діб при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, у присутності або без інтервалу різних концентрацій очищених моноклональних антитіл до PD1: PD1-0050, PD1-0069, PD1-0073, PD1-0078, PD1-0098, PD1-0102, PD1-0103. Як контрольні антитіла до PD1 синтезували антитіла, які містять домени VH або VL або ніволумаба (також відомого як MDX-5C4 або MDX-1106), або пембролізумаба (також відомого як MK-3475 або Org 1.09A), і клонували з використанням остовів людського IgG1 (з мутаціями L234A, L235A і P329G (індекс EU за Kabat)). Як негативний контроль або не використовували антитіло, або використовували ізотипове контрольне антитіло, і як позитивний контроль використовували рекомбінантний людський IL-2 (20 EU/мл). Після доби 6 з кожної

культури відбирали 100 мкл середовища для вимірювання цитокінів. Рівні IFN-гамма вимірювали з використанням набору для ELISA OptEIA (BD Biosciences).

Результати демонструються в Таблиці 5 (секреція/вивільнення IFN-γ). Моноклональні антитіла до PD1 стимулювали активацію Т-клітин і секрецію IFN-гамма концентраційнозамінним чином. Значення % збільшення секреції IFN-гамма розраховували відносно продукції IFN-γ MLR без додавання будь-яких блокуючих mAb (базальна алогенна стимуляція індукувала значення IFN-γ, що відповідає Е (експериментальний зразок) мінус с (контрольний зразок)) і MLR з додаванням 20 ЕУ/мл гес hu IL-2 (позитивний контроль - 100 % значення IFN-γ, що відповідає Е плюс с), і розраховували згідно з формулою: відн. стимуляція [%] = ((Експериментальний - Е - с)/(Е+с-Е-с))\*100.

Таблиця 5

Відсоткова частка секреції IFN-гамма після алогенної стимуляції та обробки антитілом до PD-1 у порівнянні з ефектом обробки рекомбінантним людським IL-2 (20 ЕУ/мл) (дорівнює 100 %-ому збільшенню) як позитивний контроль

	Концентрація (мкг/мл)	1:12	1:120	1:1200	Ефект в MLR
PD1-0050	44	136	96	33	+++
PD1-0069	60	76	71	55	+++
PD1-0073	43	103	63	38	++
PD1-0078	64	99	72	21	++

Декілька антитіл, блокуючих PD1: PD1-0050, PD1-0069, PD1-0073, PD1-0078, PD1-0098, PD1-0102, PD1-0103, демонстрували сильну імунomodуючу активність за допомогою збільшення секреції інтерферону-гамма (INF-γ) (дані не показані для всіх антитіл).

3Б) У додатковому експерименті оцінювали химерне PD1-0103 (людський ізотип IgG1 з мутаціями L234A, L235A і P329G (індекс EU за Kabat)). Блокада PD1 химерним PD-0103 сильно збільшує секрецію IFN-гамма алогенними стимульованими первинними людськими Т-клітинами. Химерне PD1-0103 є більш потужним, ніж контрольні антитіла до PD1 (див. Фіг. 1).

Для порівняння використовували синтезовані контрольні антитіла до PD1 антитіла, які містять домени VH або VL або ніволумаба (також відомого як MDX5C4 або MDX-1106), або пембролізумаба (також відомого як MK-3475 або Org 1.09A), і клоновані з остовами людського IgG1 (з мутаціями L234A, L235A і P329G (індекс EU за Kabat)).

3В) У додаткових експериментах в MLR оцінювали імунomodуючу активність гуманізованих варіантів антитіла до PD-1 PD1-0103 (гуманізовані антитіла PD1-0103-0312, PD1-0103-0314 на Фіг. 2 і 3, див. також Приклад 6 нижче) на а) вивільнення (секрецію) IFN-γ, б) вивільнення (секрецію) TNF-альфа, як описано вище. Ефект химерного антитіла PD1-0103 та його гуманізованих версій порівнювали з контрольними антитілами до PD1, які містять домени VH або VL або ніволумаба (також відомого як MDX5C4 або MDX-1106), або пембролізумаба (також відомого як MK-3475 або Org 1.09A) з остовами людського IgG1 (з мутаціями L234A, L235A і P329G (індекс EU за Kabat)). Після 6 діб культури MLR відбирали 50 мкл супернатанту, і вимірювали багаточисленні цитокіни в одній культурі з використанням аналізу людських цитокінів Th1/Th2 Bio-Plex Pro™ (Bio-Rad Laboratories Inc.). (Дані для всіх цитокінів не показані).

Химерне антитіло PD1-0103 та його гуманізовані версії (PD1-0103\_0312 і PD1-0103\_0314) були більш ефективними у порівнянні з контрольними антитілами до PD1 в посиленні активації Т-клітин і секреції IFN-гамма (див. Фіг. 2).

Крім того, химерне антитіло PD1-0103 та його гуманізовані варіанти збільшують секрецію фактора некрозу пухлин альфа (TNF альфа) (див. Фіг. 3) і IL-12 (дані не показані) антигенпрезентуючими клітинами і збільшують здатність моноцитів/макрофагів або антигенпрезентуючих клітин стимулювати Т-клітини.

Приклад 4:

Ефект блокади антитілом до PD1 на вивільнення цитотоксичного гранзиму В і секрецію IFN-γ людськими Т-клітинами CD4, співкультивованими з алогенними зрілими дендритними клітинами

Для подальшого дослідження ефекту обробки антитілом до PD-1 в алогенній ситуації автори винаходу розробили аналіз, в якому свіжоочищені Т-клітини CD4 співкультивували протягом 5 діб у присутності таких, що походять від моноцитів алогенних зрілих дендритних клітин (mDC). Моноцити виділяли зі свіжих PBMC за один тиждень до безперешкодного прикріплення до

пластмаси, з наступним видаленням клітин, що не прикріпилися. Потім автори винаходу одержали незрілі DC з моноцитів за допомогою їх культивування у середовищах, які містять GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор) (50 нг/мл) і IL-4 (100 нг/мл) протягом 5 діб. Для індукції дозрівання iDC (незрілі дендритні клітини) автори винаходу

додавали у культуральні середовища TNF-альфа, IL-1 бета і IL-6 (по 50 нг/мл кожного) протягом 2 додаткових діб. Потім автори винаходу оцінювали дозрівання DC за допомогою вимірювання експресії на їх поверхні головного комплексу гістосумісності класу II (MHCII), CD80, CD83 і CD86 за допомогою проточної цитометрії (LSRFortessa, BD Biosciences).

На добу мінімальної реакції змішаних лімфоцитів (mMLR) збагачували Т-клітини CD4 за допомогою набору мікрокульок (Miltenyi Biotec) з  $10^8$  PBMC, одержаних від неспорідненого донора. До культивування Т-клітини CD4 мітили 5 мкМ складного сукцинімідолового ефіру карбоксифлуоресцеїну (CFSE). Потім висаджували у 96-ямковий планшет  $10^5$  Т-клітин CD4 разом із зрілими ало-DC (5:1) у присутності або за відсутністю блокуючого антитіла до PD1 (або PD1-0103, химерне PD1-0103, або гуманізовані антитіла PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314, PD1-0103-0315, скорочені на Фіг. 4А і 4Б як 0312, 0313, 0314, 0315) в концентрації 10 мкг/мл, якщо на Фіг. не вказано інше.

Через п'ять діб автори винаходу відбирали супернатанти культури клітин, що використовуються пізніше для вимірювання рівнів IFN-гамма за допомогою ELISA (R&D Systems), і залишали клітини при 37 градусах С протягом ще 5 годин у присутності інгібітора апарату Гольджи (брефельдин А) і блокатора апарату Гольджи (моненсин). Клітини потім промивали, фарбували на поверхні антитілом до людського CD4 і фіксованим барвником на живі/мертві клітини Aqua (Invitrogen) перед фіксацією/пермеабілізацією буфером Fix/Perm (BD Bioscience). Автори винаходу здійснювали внутрішньоклітинне фарбування на гранзим В (BD Bioscience), IFN-гамма і IL-2 (обидва від eBioscience). Результати показані на Фіг. 4А та 4Б.

Автори винаходу також тестували різні концентрації гуманізованих варіантів PD1-0103 (гуманізовані антитіла PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314, PD1-0103-0315, скорочені на Фіг. як 0312, 0313, 0314, 0315, див. також Приклад 6 нижче) і виявили, що вони є однаково хорошими у збільшенні рівня гранзиму В і інтерферону-гамма. DP47 являє собою людський IgG, що не зв'язується, з мутацією LALA в частині Fc для того, щоб запобігти розпізнаванню FcгаммаR (рецептор Fcγ), і його використовували як негативний контроль.

#### Приклад 5:

##### Похідні у вигляді химерних антитіл

Химерні антитіла до PD1 одержали ампліфікацією варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюга мишиних антитіл до PD1 PD1-0098, PD1-0103 за допомогою ПЦР та їх клонування в експресійні вектори для важкого ланцюга у вигляді злитих білків з людськими остовами IgG1 / людської CH1-шарнірна ділянка-CH2-CH3 з мутаціями L234A, L235A і P329G (індекс EU за Kabat)) (лейцин 234 до аланіну, лейцин 235 до аланіну, пролін 329 до гліцину), що відмінняють ефекторні функції, і в експресійні вектори для легкого ланцюга у вигляді злитих білків з людською С-каппа. Плазміді LC і HC потім співтрансфікували в HEK293 та очищували через 7 діб із супернатантів стандартними способами очищення антитіл. Химерні антитіла до PD1 були перейменовані в химерне chiPD1-0098 (chiPD1-0098) і химерне PD1-0103 (chiPD1-0103). Для порівняння використовували синтезовані контрольні антитіла до PD1, які містять домени VH або VL або ніволумаба (також відомого як MDX-5C4 або MDX-1106), або пембролізумаба (також відомого як MK-3475 або Org 1.09A), і клоновані з остовами людського IgG1 (з мутаціями L234A, L235A і P329G (індекс EU за Kabat)).

#### Приклад 6:

Одержання, експресія та очищення гуманізованих варіантів антитіла до PD1 PD-0103 (huMab PD-0103), і Характеризація

##### Гуманізація доменів VH і VL мишиного антитіла до PD1 0103

На основі амінокислотної послідовності мишиних доменів VH і VL мишиного антитіла до PD1 0103 (SEQ ID NO: 7 і 8) одержали гуманізовані варіанти антитіла до PD1.

Гуманізований варіант VH базується на людській зародковій лінії IMGT\_hVH\_3\_23 в комбінації з людським J-елементом зародкової лінії IGJ5-01 з декількома мутаціями (призводячи до SEQ ID NO: 57).

Гуманізовані варіанти VL базуються на людських зародкових лініях IMGT\_hVK\_4\_1, IMGT\_hVK\_2\_30, IMGT\_hVK\_3\_11 і IMGT\_hVK\_1\_39 в комбінації з людським J-елементом зародкової лінії IGJ1-01. Різні мутації призводили до гуманізованих варіантів SEQ ID NO: 58-SEQ ID NO: 61.

Гуманізовані амінокислотні послідовності для варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюга PD1-0103 зворотно транскрибували в ДНК, синтезували одержані в результаті кДНК

- (GenArt) і потім клонували в експресійні вектори для важкого ланцюга у вигляді злитих білків з остовами людського IgG1 / людським CH1-шарнірна ділянка-CH2-CH3 з мутаціями LALA і PG (лейцин 234 до аланіну, лейцин 235 до аланіну, пролін 329 до гліцину), що відмінюють ефекторні функції, або в експресійні вектори для легкого ланцюга у вигляді злитих білків з людською С-каппа. Плазміді LC і HC потім співтрансфікували в HEK293 і очищували через 7 діб із супернатантів стандартними способами очищення антитіл. Одержані в результаті гуманізовані антитіла до PD1 називали наступним чином:

Таблиця 6

## Послідовності VH і VL гуманізованих варіантів антитіл PD1-0103

Гуманізовані антитіла PD1-0103	гуманізований варіант VH/SEQ ID NO:	гуманізований варіант VL/SEQ ID NO:
PD1-0103-0312	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 58
PD1-0103-0313	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 59
PD1-0103-0314	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 60
PD1-0103-0315	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 61

Таблиця 7

## Послідовності HVR гуманізованих варіантів антитіл PD1-0103

Гуманізовані антитіла PD1-0103	HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3 гуманізованого варіанта/SEQ ID NO:	HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3 гуманізованого варіанта /SEQ ID NO:
PD-0103-0312	SEQ ID NO: 1, 2 і 3	SEQ ID NO: 4, 5 і 6
PD-0103-0313	SEQ ID NO: 1, 2 і 3	SEQ ID NO: 4, 5 і 6
PD-0103-0314	SEQ ID NO: 1, 2 і 3	SEQ ID NO: 4, 5 і 6
PD-0103-0315	SEQ ID NO: 1, 2 і 3	SEQ ID NO: 4, 5 і 6

10

Гуманізовані варіанти антитіла PD1-0103 і батьківське химерне PD1-0103 були охарактеризовані, як описано вище. Результати показані в Таблиці 8.

Таблиця 8

## стисле викладення результатів для варіантів гуманізованого антитіла PD1-0103 і батьківського химерного PD1-0103

Аналіз	химерне PD1-0103	PD-0103-0312	PD-0103-0313	PD-0103-0314	PD-0103-0315
Афінність $K_D$ 37 °C [нМ] *	2,0 / 0,8	1,5 / 1,8	1,9 / 2,3	1,6 / 1,5	1,7 / 1,5
EC50 ELISA [нМ]	0,2	0,1	0,07	0,07	0,06
EC50 CHO-PD1	+	+	+	+	+
IC50 PD-L1, 2 [нМ]	1,35	tbd (підлягає визначенню)	tbd	tbd	tbd
Аналіз реакції змішаної культури лімфоцитів	+++	+++	+++	++++	++
перехресна реактивність з антигенами яванського макака (EC50 [нМ])	+	0,08	0,06	0,05	0,04

15

## Приклад 7:

## Нейтралізуюча ефективність антитіл до PD-1

Для тестування нейтралізуючої ефективності одержаних самими авторами винаходу антитіл до PD-1 в імітації відновлення приглушеної відповіді Т-клітин in vitro використовували наявний в продажу репортерний аналіз PD1/PD-L1 (Promega). Дана система складається з клітин PD+NFBT Jurkat і партнера PD-L1+CHO, який також дає активуючий сигнал. В принципі, дана репортерна система базується на трьох стадіях: (1) TCR-опосередкована активація NFAT, (2)

20

інгібування сигналу NFAT при активації осі PD-1/PD-L1 і (3) відновлення сигналу NFAT за допомогою антитіл, блокуючих PD-1.

Матеріал і методи

• Середовище PD-L1: PAN Biotech (#P04-03609); FBS (10 %) і L-Gln (4 mM)

5 • Середовище для аналізу: RPMI 1640 (#31870; Invitrogen), 25 mM HEPES, 2 mM L-Gln, FBS (2 %)

• Клітини, використані для даного аналізу (обидва типи клітин придбані Promega):

клітини CHO PD-L1+ (№ партії #139147):  $2-3 \times 10^4$  клітин/96 ямок

клітини Jurkat PD-1+NFAT (№ партії #133024:  $3,5 \times 10^4$  клітин/ямку

10 На добу 1 клітини PD-L1+ відтавали, висівали у вказаній концентрації клітин у вищезазначене середовище і культивували протягом ночі при 37 °C і 5 % CO<sub>2</sub>. На наступну добу середовище видаляли, і клітини PD-L1+ інкубували з одержаними антитілами у вказаних концентраціях (у середовищі для аналізу). Паралельно клітини Jurkat PD-1+NFAT відтавали, і вищезазначені кількості клітин переносили і співкультивували до клітин PD-L1+. Після інкубації  
15 протягом 6 годин при 37 °C і 5 % CO<sub>2</sub> субстрат Bio-Glo нагрівали до кімнатної температури (1-2 години до додавання). Планшет з культурою клітин видаляли з інкубатора і доводили до кімнатної температури (10 хв) перед додаванням 80 мкл розчину Bio-Glo на ямку, інкубували протягом 5-10 хв перед вимірюванням люмінесценції на рідері Tecan Infinite згідно з  
20 рекомендацією виробника набору. Результати можна бачити на Фіг. 5А і 5Б, де показане відновлення опосередкованого PD-1/PD-L1 приглушення сигналу NFAT різними антитілами до PD-1 при стимуляції TCR: Фіг. 5А: химерне PD1\_0103 демонструвало відтворено більший ефект у порівнянні з контрольним антитілом. Як контроль синтезували антитіло до PD-1, що містить домени VH або VL ніволумаба (також відомого як MDX-5C4 або MDX-1106) і клонували з остовами людського IgG1 (з мутаціями L234A, L235A і P329G (індекс EU за Kabat)). Фіг. 5Б: 25 чотири гуманізованих варіанти PD1\_0103 демонстрували аналогічну ефективність in vitro з лідируючим антитілом і також були трохи краще контрольного антитіла.

Приклад 8:

Кристалізація Fab PD1-0103 з ектодоменом PD-1:

Для утворення комплексу Fab PD1-0103 змішували в молярному надлишку 1,1 з  
30 ектодоменом PD-1. Після інкубації на льоду протягом 1 години комплекс деглікозилювали за допомогою стадії з PNGазою для видалення гліканів, які не беруть участі в утворенні комплексу. Скринінг кристалізації на кристали комплексу фрагмента Fab PD1-0103 (з людським CH1 і CL) з ECD PD-1 проводили при концентрації 15 мг/мл. В експериментах з дифузійною парів у сидячій краплі встановлювали температуру крапель кристалізації 21 °C за допомогою змішування 0,1  
35 мкл розчину білка з 0,1 мкл резервуарного розчину. Кристали з'являлися за різних умов за наявності PEG як осаджуючого агента. Кристали, що використовуються для визначення структури, з'являлися з 30 % PEG1500 в межах 4 діб і виростали до кінцевого розміру  $0,03 \times 0,06 \times 0,02$  мкм в межах 7 діб.

Кристали переносили в резервуарний розчин, доповнений 20 % гліцерину як криопротектора,  
40 і потім швидко охолоджували в рідкому N<sub>2</sub>. Картини дифракції одержали з використанням детектора Pilatus 6M при температурі 100K з каналом пучка X10SA Swiss Light Source та обробляли з використанням пакета XDS [Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. J. Appl. Cryst. 26, 795-800 (1993)]. Дані від одного кристала об'єднували з одержанням набору даних з розрізненням 1,9 Å  
45 в групі симетрії кристалічної решітки P1 з двома молекулами комплексу на кристалографічну асиметричну комірку (див. Таблицю 1).

Структуру визначали за допомогою молекулярного заміщення з використанням координат Fab фрагмента з PDB-ID 3UTZ як пошукової моделі. Як пошукові координати для ECD PD-1 використовували PDB-ID 3RRQ. Fab був розділений на константний і варіабельний домени, і з  
50 обома окремими пошуками в CCP4 використовували програму PHASER CCP4 [CCP4 (Collaborative Computational Project, N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Acta Crystallogr. D, 760-763 (1994)] для того, щоб пояснити можливі зміни кута плеча. Модель перебудовували в COOT (Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. & Cowtan, K. Features and development of COOT. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 60, 486-501 (2010)) і уточнювали з  
55 використанням програми CCP4 REFMAC. Етапи кінцевого уточнення здійснювали з використанням програми BUSTER (Bricogne G., Blanc E., Brandl M., Flensburg C., Keller P., Paciorek W., Roversi P., Sharff A., Smart O.S., Vonrhein C., Womack T.O. (2016). BUSTER version 2.11.6. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.).

Таблиця 9

Збір даних і статистика уточнення структури для кристала  
Fab PD1-0103-ECD PD-1

Збір даних	
Довжина хвилі (Å)	1,0
розрізнення <sup>1</sup> (Å)	48,27-1,90 (1,99-1,90)
Група симетрії кристалічної решітки	P1
Елементарна комірка (Å, °)	66,37 69,82 86,09 99,17 98,01 119,40
Загальне відбиття	170515 (20750)
Унікальні відбиття	97997 (12250)
Множинність	1,72 (1,66)
Повнота (%)	0,97 (0,96)
Середнє I/σ(I)	8,02 (0,86)
В-фактор Уілсона	30,30
Вимірювання R	0,093 (0,610)
CC1/2	0,999 (0,290)
Уточнення	
Відбиття, що використовуються в уточненні	97986 (6792)
Відбиття, що використовуються для R-вільного	4754 (355)
R-робота <sup>3</sup>	0,1899 (0,2290)
R-вільне <sup>4</sup>	0,2291 (0,2628)
Число атомів, що не є атомами водню	9235
макромолекули	8199
Вуглевод	162
Білкові залишки	1068
RMS (середньоквадратичне значення) зв'язків (Å)	0,013
RMS кутів (°)	1,81
Відсоток залишків у переважній ділянці за картою Рамачандрана (%)	97
Допущення за картою Рамачандрана (%)	2,9
Повні маргінальні залишки за картою Рамачандрана (%)	0,38
Випадаючі значення ротамерів (%)	2,1
Бальна оцінка зіткнень	2,60
Середній В-фактор (Å²)	36,98
макромолекули	36,01
вуглевод	49,62
розчинник	38,12

<sup>1</sup> Значення в дужках належать до наборів з найвищим розрізненням.

<sup>2</sup>  $R_{\text{об'єднаний}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$ , де I являє собою інтенсивність.

<sup>3</sup>  $R_{\text{робота}} = \sum |F_o - \langle F_c \rangle| / \sum F_o$ , де  $F_o$  являє собою таку, що спостерігається, і  $F_c$  являє собою розрахункову амплітуду структурного множника.

<sup>4</sup>  $R_{\text{вільний}}$  був розрахований на основі 5 % від всіх даних, опущених під час уточнення

## Визначення структури Fab PD1-0103 в комплексі з ектодоменом PD-1

- 5 Для того щоб детально охарактеризувати епітоп і паратоп, автори винаходу визначили кристалічну структуру ектодомену PD-1 в комплексі з Fab PD1-0103 до розрізнення 1,9 Å. Дана структура виявляє те, що Fab PD1-0103 розпізнає епітоп, утворений ділянками петель BC і FG і залишками β-тяжів CC'FG передньої β-складчастої структури домену Ig V-типу PD-1. Крім того, даний епітоп включає дерево N-зв'язаного глікозилювання в положенні Asn58, яке є частиною петлі BC PD-1. Всі CDR, за виключенням CDR2 легкого ланцюга Fab PD1-0103, вносять внесок у паратоп.

- 10 Площа поверхні 1063 Å² PD-1 покривається Fab PD1-0103, причому внесок важкого ланцюга становить 743 Å², а легкого ланцюга - 320 Å². Аналіз поверхні контакту зв'язування з використанням програми PISA виявляє картину взаємодії Fab PD1-0103 з ECD PD-1 з 6 водневими зв'язками і вандерваальсовими силами. Водневі зв'язки бокових ланцюгів

утворюються між залишками CDR1 важкого ланцюга (Thr33) і CDR2 (Ser52, Arg56, Asp57) з Glu61 і Ser62 петлі BC PD-1. Вандерваальсови контакти, головним чином, керуються CDR3 легкого і важкого ланцюга, зокрема, Phe105 HCDR3 і Tyr32 HCDR1, які знаходяться на близькій відстані від залишків Val64 петлі BC, Pro83, Ile126 і Leu128 петлі FG. Додаткові вандерваальсови контакти спостерігаються між залишками петлі FG Pro130, Ala132, Ile134 з CDR2 важкого ланцюга і CDR3 легкого ланцюга Fab PD1-0103. Легкий ланцюг Fab PD1-0103 контактує виключно з петлею FG PD-1. CDR2 легкого ланцюга не надає контактів для утворення комплексу.

Дерево N-зв'язаного глікозилювання в положенні Asn58 PD-1 є частиною епітопа і взаємодіє тільки із залишками важкого ланцюга Fab PD1-0103.

Дерево центрального цукрового ланцюга (N-зв'язаного глікозилювання) в положенні Asn58 PD-1 має наступну структуру відносно моносахаридів:

Asn58-N-GlcNAc(FUC) - GlcNAc- - BMA - MAN (див. Фіг. 9), де використовуються наступні скорочення:

[GlcNAc] = NGA=N-ацетил-бета-D-галактозамін = 2-(ацетиламіно)-2-дезоксид-бета-D-галактопіраноза,

[FUC] = альфа-L-фукоза,

[BMA] = бета-D-манопіраноза,

[MAN] = альфа-D-манопіраноза.

Перший GlcNAc у цукровому ланцюзі фукозилується, що скорочується як GlcNAc(FUC).

В структурі центральні глікани добре визначаються в електронній щільності, за виключенням однієї манозної ланки. Фукозне групування направлене в гідрофільний карман, утворений PD-1 з CDR1 і CDR2. Зв'язування фукози координується мережею водневих зв'язків з Ser30 і Ser31 CDR1 разом з Glu61 і Gln99 PD-1. Додаткові контакти надаються зв'язуванням водневими зв'язками першого GlcNAc з Arg56 і залишками каркаса Arg72, Asp73, Asn74 з Man.

Таблиця 10

Перелік контактів PD1 - важкий ланцюг Fab PD1-0103  
Контакти, ідентифіковані за пороговою відстанню 5 Å

PD1	HC (важкий ланцюг) PD-103
Ser60	Asp57, Tyr59
Glu61	Thr33, Ser52, Gly53, Gly54, Arg56, Asp57
Ser62	Thr33, Ser52, Asp57, Phe105
Phe63	Phe105
Val64	Gly101, Arg102, Phe105
Tyr68	Tyr104
Lys78	Arg102
Phe82	Ser31
Pro83	Ser31, Tyr32
Glu84	Tyr32
Ile126	Gly101, Tyr104, Phe105
Ser127	Phe105
Leu128	Tyr59, Leu99, Phe105
Pro130	Tyr59
Ile134	Tyr104

Таблиця 11

Перелік контактів PD1 - легкий ланцюг Fab PD1-0103  
Контакти, ідентифіковані за пороговою відстанню 5 Å

PD1	LC (легкий ланцюг) PD-103
Ile126	Phe36
Leu128	Asn95, Trp100
Pro130	Asn95, Tyr96, Asp97, Val98
Lys131	Tyr96, Asp97
Ala132	Asn95, Tyr96, Asp97, Thr31, Phe36

Таблиця 11

Перелік контактів PD1 - легкий ланцюг Fab PD1-0103  
Контакти, ідентифіковані за пороговою відстанню 5 Å

PD1	LC (легкий ланцюг) PD-103
Gln133	Thr31
Ile134	Thr31, Ser32, Asn34, Phe36

Таблиця 12

Перелік контактів центральний цукровий ланцюг на Asn58 PD1 -  
важкий ланцюг Fab PD1-0103  
Контакти, ідентифіковані за пороговою відстанню 5 Å

PD1 - N- глікозилювання на Asn58 (центральний цукровий ланцюг)	HC PD-103
Перший GlcNAc	Arg56, Asp57
FUC	Ser30, Ser31, Tyr32, Gly53, Gly54,
Другий GlcNAc	Gly54, Gly55, Arg56
BMA	Gly54, Asn74
MAN	Gly53, Gly54, Gly55, Arg72, Asp73, Asn74

#### Узагальнення

• Епітоп на PD1 має схожість з плоскою поверхнею, яка зв'язується, головним чином, передньою β-складчастою структурою і CDR3 PD1

- Взаємодії включають полярні і вандерваальсові контакти
- Велика площа поверхні взаємодії PD1 з важким ланцюгом Fab
- Глікозилювання в положенні Asn 58 бере участь в зв'язуванні PD1 з фрагментом Fab
- Фукозна ланка займає карман, утворений PD1 і важким ланцюгом Fab PD1-0103.

#### Приклад 9:

Знижене зв'язування антитіла з людським PD1, який не є глікозильованим на Asn58 у порівнянні із зв'язуванням з людським PD1, який є глікозильованим на Asn58 (Характеризація Біасоре антитіла проти PD-1 до глікозильованих і неглікозильованих рекомбінантних PD1)

Аналіз на основі поверхневого плазмонного резонансу (SPR) використовували для визначення кінетичних параметрів зв'язування між глікозильованим PD1 і неглікозильованим рекомбінантним людським PD1. В зв'язку з цим антитіло до людського IgG іммобілізували за допомогою амінного зв'язування з поверхнею сенсорного чипа CM5 (Biacore). Потім захоплювали зразки, і з ними зв'язувався hu PD1-ECD. Поверхню сенсорного чипа регенерували після кожного циклу аналізу. Зрештою, одержали рівноважну константу і кінетичні константи швидкості за допомогою апроксимації даних до моделі взаємодії Лангмюра 1:1.

Приблизно 2000 одиниць відповіді (RU) 20 мкг/мл антитіла до людського IgG (GE Healthcare #BR-1008-39) зв'язували з проточними комітками 1 і 2 (як альтернатива: 3 і 4) сенсорного чипа CM5 в Biacore T200 при pH 5,0 за допомогою застосування набору амінного зв'язування, який постачають GE Healthcare.

Буфером для зразка і рухомим буфером був HBS-EP+ (0,01 M HEPES, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05 % об./об. поверхнево-активна речовина P20, pH 7,4). Була встановлена температура проточної комірки 25 °C і температура відсіку для зразка 12 °C. Система була первинно оброблена рухомим буфером.

Зразки з концентрацією 10 нМ ін'єктували протягом 20 секунд, і вони зв'язувались з другою проточною коміркою. Потім над кожним зразком протягом 200 с ін'єктували повний набір концентрацій людського PD1-ECD (глікозильованого і неглікозильованого) (200 нМ, 66,6 нМ, 22,2 нМ, 7,4 нМ, 2,46 нМ і 0 нМ), з наступним часом дисоціації 0/2000 с (66,6 нМ і 22,2 нМ) і двома 20 с стадіями регенерації 3 M MgCl<sub>2</sub>, з яких щонайменше одна містила "додаткове промивання після ін'єкції" рухомим буфером.

Зрештою, дані з подвійним контролем апроксимували до моделі взаємодії Лангмюра 1:1 з використанням програми Biacore T200 Evaluation. Одержані в результаті значення K<sub>D</sub>, K<sub>a</sub> і k<sub>d</sub> показані в Таблиці 13.



Кінетичні константи швидкості та рівноважна константа, визначені Biacore

Ліганд	Зразок	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
PD1-0103-0312	PD1, неглікозильований на Asn58	3,36E+05	2,70E-02	8,02E-08
PD1-0103-0312	PD1, глікозильований на Asn58	7,77E+05	7,46E-05	9,61E-11
пембролізумаб	PD1, неглікозильований на Asn58	1,51E+06	2,46E-03	1,63E-09
пембролізумаб	PD1, глікозильований на Asn58	1,87E+06	4,50E-03	2,41E-09
ніволумаб	PD1, неглікозильований на Asn58	5,49E+05	3,66E-03	6,66E-09
ніволумаб	PD1, глікозильований на Asn58	4,44E+05	1,63E-03	3,68E-09

Мається явна різниця між зв'язуванням PD-103-0312 з неглікозильованим і глікозильованим PD-1, на відміну від пембролізумаба і ніволумаба (див. також Фіг. 13A і 13B).

Приклад 10:

5 Протипухлинна ефективність антитіл до PD1 in vivo в комбінації з Т-клітинним біспецифічним антитілом проти CEA

Гуманізовану тварину одержали за допомогою адаптації мишей NOG з наступним адоптивним перенесенням людських гематопоетичних стовбурових клітин. Одержані в результаті миші демонструють химерне відношення між людськими і мишиними лейкоцитами, що варіюється від 20 до 85 % клітин людського походження. В такій моделі Т-клітини є функціональними і можуть бути активовані для умертвіння пухлинних клітин за допомогою біспецифічного антитіла, яке зв'язується з CEA (раковий ембріональний антиген) і CD3 (яке описується в WO2014/131712). Таким гуманізованим тваринам потім ін'єктували один мільйон CEA-позитивних пухлинних клітин - карциноми шлунка MKN45 - підшкірно в латеральну ділянку. Ріст пухлини міг оцінюватися вимірюванням 3-мірної осі пухлини за допомогою циркуля, що керується оператором, 3 рази на тиждень (Фіг. 14A і B). На добу 9 після ін'єкції пухлини мишей рандомізували на основі розміру пухлини для того, щоб мати гомогенні групи тварин, і починалося терапевтичне лікування. За виключенням груп носія (Фіг. 14A і 14B, круги), всім групам мишей внутрішньовенно вводили CEACD3TCB в дозі 2,5 мг/кг двічі на тиждень. Крім того, кожному групі мишей також обробляли одним партнером за комбінацією: антитілом до PD1 (PD1-0103-0212) або в дозуванні 0,15 мг/кг щотижнево (Фіг. 14A, квадрати), або 1,5 мг/кг (Фіг. 14B, квадрати) щотижнево внутрішньобрюшинно; ніволумабом або в дозуванні 0,15 мг/кг щотижнево (Фіг. 14A, ромби), або 1,5 мг/кг (Фіг. 14B, ромби) щотижнево внутрішньобрюшинно. Середній розмір пухлини в межах однієї групи обробки демонструється протягом часу. Кожний група складалася з 9-10 мишей, і вимірювання продовжували доти, доки було щонайменше 3 миші на групу. Розраховували стандартизовану площу під кривою (sAUC), і однофакторний ANOVA (дисперсійний аналіз) використовували для розрахунку статистичної значущості.

#### ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

30 <110> F. Hoffmann-La Roche AG  
 <120> АНТИТІЛА ДО PD1 І СПОСОБИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ  
 35 <130> P33103-WO  
 <150> EP15188061.4  
 <151> 2015-10-02  
 40 <160> 77  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 45 <211> 7  
 <212> ПРТ  
 <213> Mus Musculus  
 <400> 1  
 50 Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr  
 1 5

5 <210> 2  
 <211> 3  
 <212> PPT  
 <213> Mus Musculus  
 <400> 2  
 Gly Gly Arg  
 10 1  
 <210> 3  
 <211> 9  
 <212> PPT  
 15 <213> Mus Musculus  
 <400> 3  
 Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp  
 20 1 5  
 <210> 4  
 <211> 11  
 <212> PPT  
 25 <213> Mus Musculus  
 <400> 4  
 Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser Asp Asn Ser Phe  
 30 1 5 10  
 <210> 5  
 <211> 3  
 <212> PPT  
 35 <213> Mus Musculus  
 <400> 5  
 Arg Ser Ser  
 40 1  
 <210> 6  
 <211> 6  
 <212> PPT  
 45 <213> Mus Musculus  
 <400> 6  
 Asn Tyr Asp Val Pro Trp  
 50 1 5  
 <210> 7  
 <211> 120  
 <212> PPT  
 55 <213> Mus Musculus  
 <400> 7  
 Glu Val Ile Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 60 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr  
 65 20 25 30  
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Asp Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 70 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 5 Leu Glu Met Ser Ser Leu Met Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 10 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 8  
 <211> 111  
 <212> PPT  
 <213> Mus Musculus  
 <400> 8  
 20 Lys Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser  
 25 20 25 30  
 Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro  
 35 40 45  
 30 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp  
 65 70 75 80  
 35 Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr  
 85 90 95  
 40 Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 <210> 9  
 <211> 8  
 <212> PPT  
 <213> Mus Musculus  
 <400> 9  
 50 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr  
 1 5  
 <210> 10  
 <211> 3  
 <212> PPT  
 <213> Mus Musculus  
 <400> 10  
 60 Tyr Ser Gly  
 1  
 <210> 11  
 <211> 9  
 <212> PPT  
 <213> Mus Musculus  
 65 <400> 11  
 70 His Gly Ser Ala Pro Trp Tyr Phe Asp  
 1 5

<210> 12  
 <211> 12  
 <212> ПРТ  
 5 <213> Mus Musculus  
 <400> 12  
 Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr  
 10 1 5 10  
 <210> 13  
 <211> 3  
 <212> ПРТ  
 15 <213> Mus Musculus  
 <400> 13  
 Lys Val Ser  
 20 1  
 <210> 14  
 <211> 6  
 <212> ПРТ  
 25 <213> Mus Musculus  
 <400> 14  
 Gly Ser His Phe Pro Leu  
 30 1 5  
 <210> 15  
 <211> 120  
 <212> ПРТ  
 35 <213> Mus Musculus  
 <400> 15  
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 40 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 20 25 30  
 45 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asp Lys Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Leu Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 50 55 60  
 Lys Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Leu Asn Ser Val Ala Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 55 85 90 95  
 Ala Arg Trp His Gly Ser Ala Pro Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg  
 100 105 110  
 60 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 16  
 65 <211> 112  
 <212> ПРТ  
 <213> Mus Musculus  
 <400> 16  
 70

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 5 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser  
 20 25 30  
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 10 Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Arg Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 15 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95  
 20 Ser His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110  
 <210> 17  
 <211> 8  
 <212> PPT  
 25 <213> Mus Musculus  
 <400> 17  
 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr  
 1 5  
 30 <210> 18  
 <211> 3  
 <212> PPT  
 35 <213> Mus Musculus  
 <400> 18  
 Tyr Thr Gly  
 1  
 40 <210> 19  
 <211> 9  
 <212> PPT  
 45 <213> Mus Musculus  
 <400> 19  
 Met Asp Tyr Tyr Gly Ser Thr Leu Asp  
 1 5  
 50 <210> 20  
 <211> 11  
 <212> PPT  
 55 <213> Mus Musculus  
 <400> 20  
 Ser Glu Ser Val Asp Arg Tyr Gly Asn Ser Phe  
 1 5 10  
 60 <210> 21  
 <211> 3  
 <212> PPT  
 65 <213> Mus Musculus  
 <400> 21  
 Arg Ala Ser  
 1  
 70

<210> 22  
 <211> 6  
 <212> PPT  
 5 <213> Mus Musculus  
 <400> 22  
 Asn Asn Glu Asp Pro Tyr  
 10 1 5  
 <210> 23  
 <211> 120  
 <212> PPT  
 15 <213> Mus Musculus  
 <400> 23  
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 20 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 25 20 25 30  
 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 35 35 40 45  
 Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Thr Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 30 Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 35 85 90 95  
 Ala Arg Glu Met Asp Tyr Tyr Gly Ser Thr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 40 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 24  
 <211> 111  
 45 <212> PPT  
 <213> Mus Musculus  
 <400> 24  
 Lys Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Arg  
 50 1 5 10 15  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Arg Tyr  
 20 25 30  
 55 Gly Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
 Lys Val Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Phe Pro Ala  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp  
 65 65 70 75 80  
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn  
 85 90 95  
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 70

5 <210> 25  
 <211> 7  
 <212> PPT  
 <213> Mus Musculus  
 <400> 25  
 10 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 1 5  
 <210> 26  
 <211> 3  
 <212> PPT  
 15 <213> Mus Musculus  
 <400> 26  
 20 Tyr Ser Gly  
 1  
 <210> 27  
 <211> 7  
 <212> PPT  
 25 <213> Mus Musculus  
 <400> 27  
 30 Gly Ile Thr Thr Gly Phe Ala  
 1 5  
 <210> 28  
 <211> 11  
 <212> PPT  
 35 <213> Mus Musculus  
 <400> 28  
 40 Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Phe  
 1 5 10  
 <210> 29  
 <211> 3  
 <212> PPT  
 45 <213> Mus Musculus  
 <400> 29  
 50 Tyr Ala Ser  
 1  
 <210> 30  
 <211> 6  
 <212> PPT  
 55 <213> Mus Musculus  
 <400> 30  
 60 Ser Arg Glu Phe Pro Trp  
 1 5  
 <210> 31  
 <211> 118  
 <212> PPT  
 65 <213> Mus Musculus  
 <400> 31  
 70 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

5 Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Val Ile Ser Thr Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

10 Lys Asp Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

15 Leu Glu Leu Ala Arg Met Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Ile Thr Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

20 Leu Val Thr Val Ser Ala  
115

<210> 32  
<211> 111  
25 <212> ПРТ  
<213> Mus Musculus  
<400> 32

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser  
20 25 30

35 Ser Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Gln Pro Pro  
35 40 45

40 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
50 55 60

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

45 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Arg  
85 90 95

Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

50 <210> 33  
<211> 7  
<212> ПРТ  
<213> Mus Musculus  
55 <400> 33

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
1 5

60 <210> 34  
<211> 3  
<212> ПРТ  
<213> Mus Musculus  
65 <400> 34

Gly Gly Arg  
1

70



<210> 35  
 <211> 5  
 <212> PPT  
 <213> Mus Musculus  
 5 <400> 35  
 Tyr Tyr Gly Ile Asp  
 1 5  
 10  
 <210> 36  
 <211> 7  
 <212> PPT  
 15 <213> Mus Musculus  
 <400> 36  
 Ser Gln Asp Val Thr Thr Ala  
 20 1 5  
 <210> 37  
 <211> 3  
 <212> PPT  
 25 <213> Mus Musculus  
 <400> 37  
 Trp Ala Ser  
 30 1  
 <210> 38  
 <211> 6  
 <212> PPT  
 35 <213> Mus Musculus  
 <400> 38  
 His Tyr Ser Ile Pro Trp  
 40 1 5  
 <210> 39  
 <211> 116  
 <212> PPT  
 45 <213> Mus Musculus  
 <400> 39  
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 50 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 55 Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 60 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Asn Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Tyr Tyr Tyr Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val  
 100 105 110  
 70 Thr Val Ser Ser

115

5 <210> 40  
 <211> 107  
 <212> ПРТ  
 <213> Mus Musculus  
 <400> 40  
 10 Asp Ile Val Met Thr Gln Pro His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Arg Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Thr Thr Ala  
 20 25 30  
 15 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 20 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
 65 70 75 80  
 25 Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ile Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105  
 30 <210> 41  
 <211> 7  
 <212> ПРТ  
 <213> Mus Musculus  
 35 <400> 41  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Thr  
 1 5  
 40 <210> 42  
 <211> 3  
 <212> ПРТ  
 <213> Mus Musculus  
 45 <400> 42  
 Ser Asp Ser  
 1  
 50 <210> 43  
 <211> 3  
 <212> ПРТ  
 <213> Mus Musculus  
 55 <400> 43  
 Pro Phe Asp  
 1  
 60 <210> 44  
 <211> 7  
 <212> ПРТ  
 <213> Mus Musculus  
 65 <400> 44  
 Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
 1 5  
 70

<210> 45  
 <211> 3  
 <212> ПРТ  
 <213> Mus Musculus  
 5 <400> 45  
 Ser Ala Ser  
 1  
 10 <210> 46  
 <211> 6  
 <212> ПРТ  
 <213> Mus Musculus  
 15 <400> 46  
 His Tyr Ser His Pro Phe  
 1 5  
 20  
 <210> 47  
 <211> 114  
 <212> ПРТ  
 25 <213> Mus Musculus  
 <400> 47  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Thr  
 20 25 30  
 35 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Ala Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 40 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Thr Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 45 85 90 95  
 Thr Arg Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
 100 105 110  
 50 Ser Ser  
 <210> 48  
 <211> 107  
 55 <212> ПРТ  
 <213> Mus Musculus  
 <400> 48  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
 20 25 30  
 65 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60  
 70

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Ala Ile Ser Ser Val Gln Ala  
 65 70 75 80  
 5 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser His Pro Phe  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105  
 10  
 <210> 49  
 <211> 8  
 <212> PPT  
 <213> Mus Musculus  
 15  
 <400> 49  
 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr  
 1 5  
 20  
 <210> 50  
 <211> 3  
 <212> PPT  
 <213> Mus Musculus  
 25  
 <400> 50  
 Ser Ser Gly  
 1  
 30  
 <210> 51  
 <211> 6  
 <212> PPT  
 <213> Mus Musculus  
 35  
 <400> 51  
 Arg Asn Trp Tyr Phe Asp  
 1 5  
 40  
 <210> 52  
 <211> 13  
 <212> PPT  
 <213> Mus Musculus  
 45  
 <400> 52  
 Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Thr Gln Lys Asn Tyr  
 1 5 10  
 50  
 <210> 53  
 <211> 3  
 <212> PPT  
 <213> Mus Musculus  
 55  
 <400> 53  
 Trp Ala Ser  
 1  
 60  
 <210> 54  
 <211> 6  
 <212> PPT  
 <213> Mus Musculus  
 65  
 <400> 54  
 Asp Tyr Thr Phe Pro Leu  
 1 5  
 70

<210> 55  
 <211> 117  
 <212> ПРТ  
 <213> Mus Musculus  
 5 <400> 55  
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10  
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly  
 20 25 30  
 Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Met Gly Phe Ile His Ser Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 20 Lys Ser Arg Ile Ser Phe Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Asp Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 25 Ala Thr Tyr Arg Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 30  
 <210> 56  
 <211> 113  
 <212> ПРТ  
 <213> Mus Musculus  
 <400> 56  
 40 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Met Arg Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
 20 25 30  
 45 Gly Thr Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asn Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 55 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ser Val Tyr Tyr Cys Gln Ser  
 85 90 95  
 Asp Tyr Thr Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu  
 100 105 110  
 60 Lys  
 65 <210> 57  
 <211> 120  
 <212> ПРТ  
 <213> Штучна  
 <220>

<223> гуманізований варіант - варіабельний домен VH важкого ланцюга PD1-0103\_01

<400> 57

5 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
10 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30  
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
15 Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
20 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
25 Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser Trp Gly Gln  
100 105 110  
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

30 <210> 58  
<211> 111  
<212> ПРТ  
<213> штучна

35 <220>  
<223> гуманізований варіант - варіабельний домен VL легкого ланцюга PD1-0103\_01

<400> 58

40 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15  
45 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser  
20 25 30  
Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
35 40 45  
50 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp  
50 55 60  
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80  
55 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr  
85 90 95  
60 Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

65 <210> 59  
<211> 111  
<212> ПРТ  
<213> штучна

<220>  
<223> гуманізований варіант - варіабельний домен VL легкого ланцюга PD1-0103\_02

70

<400> 59

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
1 5 10 15  
5 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser  
20 25 30  
10 Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro  
35 40 45  
Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp  
50 55 60  
15 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser  
65 70 75 80  
Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr  
85 90 95  
20 Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 60

<211> 111

<212> ПРТ

<213> штучна

<220>

30 <223> гуманізований варіант - варіабельний домен VL легкого ланцюга PD1-0103\_03

<400> 60

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15  
35 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser  
20 25 30  
40 Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
35 40 45  
45 Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala  
50 55 60  
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80  
50 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr  
85 90 95  
Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 61

<211> 111

<212> ПРТ

<213> штучна

<220>

60 <223> гуманізований варіант - варіабельний домен VL легкого ланцюга PD1-0103\_04

<400> 61

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15  
70 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser

	20	25	30
	Asp Asn Ser <sub>35</sub> Phe Ile His Trp Tyr <sub>40</sub> Gln Gln Lys Pro Gly <sub>45</sub> Gln Ser Pro		
5	Arg Leu <sub>50</sub> Leu Ile Tyr Arg Ser <sub>55</sub> Ser Thr Leu Glu Ser <sub>60</sub> Gly Ile Pro Ala		
10	Arg Phe Ser Gly Ser <sub>70</sub> Gly Ser Gly Thr Asp Phe <sub>75</sub> Thr Leu Thr Ile Ser <sub>80</sub>		
	Ser Leu Glu Pro Glu <sub>85</sub> Asp Phe Ala Val Tyr <sub>90</sub> Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr <sub>95</sub>		
15	Asp Val Pro Trp <sub>100</sub> Thr Phe Gly Gln Gly <sub>105</sub> Thr Lys Val Glu Ile <sub>110</sub> Lys		
	<210> 62		
	<211> 107		
20	<212> PPT		
	<213> Homo Sapiens		
	<400> 62		
25	Arg Thr Val Ala <sub>5</sub> Ala Pro Ser Val Phe Ile <sub>10</sub> Phe Pro Pro Ser Asp Glu <sub>15</sub>		
	Gln Leu Lys Ser <sub>20</sub> Gly Thr Ala Ser Val <sub>25</sub> Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe <sub>30</sub>		
30	Tyr Pro Arg <sub>35</sub> Glu Ala Lys Val Gln <sub>40</sub> Trp Lys Val Asp Asn <sub>45</sub> Ala Leu Gln		
	Ser Gly <sub>50</sub> Asn Ser Gln Glu Ser <sub>55</sub> Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser <sub>60</sub>		
35	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser <sub>70</sub> Thr Leu Thr Leu Ser <sub>75</sub> Lys Ala Asp Tyr Glu <sub>80</sub>		
40	Lys His Lys Val Tyr <sub>85</sub> Ala Cys Glu Val Thr <sub>90</sub> His Gln Gly Leu Ser <sub>95</sub> Ser		
	Pro Val Thr Lys <sub>100</sub> Ser Phe Asn Arg Gly <sub>105</sub> Glu Cys		
45	<210> 63		
	<211> 105		
	<212> PPT		
	<213> Homo Sapiens		
50	<400> 63		
	Gln Pro Lys Ala <sub>5</sub> Ala Pro Ser Val Thr Leu <sub>10</sub> Phe Pro Pro Ser Ser Glu <sub>15</sub>		
55	Glu Leu Gln Ala <sub>20</sub> Asn Lys Ala Thr Leu <sub>25</sub> Val Cys Leu Ile Ser <sub>30</sub> Asp Phe		
	Tyr Pro Gly <sub>35</sub> Ala Val Thr Val Ala <sub>40</sub> Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val		
60	Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr <sub>55</sub> Thr Pro Ser Lys Gln <sub>60</sub> Ser Asn Asn Lys		
	Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr <sub>70</sub> Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser <sub>80</sub>		
65	His Arg Ser Tyr Ser <sub>85</sub> Cys Gln Val Thr His <sub>90</sub> Glu Gly Ser Thr Val <sub>95</sub> Glu		
70			



Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 100 105  
 5 <210> 64  
 <211> 330  
 <212> PPT  
 <213> Homo Sapiens  
 <400> 64  
 10 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 15 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 20 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 25 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 25 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 30 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 35 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 40 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 40 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 45 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 50 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 55 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 60 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 65 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 70 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser<sub>325</sub> Leu Ser Pro Gly Lys<sub>330</sub>

5 <210> 65  
 <211> 330  
 <212> NPT  
 <213> homo sapiens

10 <400> 65

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

15 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

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

20 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

25 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

30 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

35 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

40 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

45 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

50 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

60 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

65 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser<sub>325</sub> Leu Ser Pro Gly Lys<sub>330</sub>

5 <210> 66  
 <211> 330  
 <212> NPT  
 <213> homo sapiens

10 <400> 66

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

15 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

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

20 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

25 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

30 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

35 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

40 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

45 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

50 Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

60 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

65 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser<sub>325</sub> Leu Ser Pro Gly Lys<sub>330</sub>

5 <210> 67  
 <211> 327  
 <212> NPT  
 <213> Homo Sapiens

10 <400> 67

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15

15 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

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

20 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

25 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

30 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125

35 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140

40 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175

45 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 195 200 205

50 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240

55 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 245 250 255

60 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 275 280 285

65 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
 290 295 300

70 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
325

5 <210> 68  
<211> 268  
<212> ПPT  
<213> Homo Sapiens

10 <400> 68

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr  
1 5 10 15

15 Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe  
20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr  
35 40 45

20 Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu  
50 55 60

25 Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu  
65 70 75 80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn  
85 90 95

30 Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala  
100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg  
115 120 125

35 Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly  
130 135 140

40 Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser  
145 150 155 160

Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys Ser Arg Ala Ala  
165 170 175

45 Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Lys Glu Asp  
180 185 190

Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly Glu Leu Asp Phe  
195 200 205

50 Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro Cys Val Pro Glu  
210 215 220

Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly Met Gly Thr Ser  
225 230 235 240

Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg Ser Ala Gln Pro  
245 250 255

60 Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu  
260 265

<210> 69  
<211> 150  
65 <212> ПPT  
<213> Homo Sapiens

<400> 69

70 Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr

	1		5		10		15									
	Phe	Ser	Pro	Ala 20	Leu	Leu	Val	Val	Thr 25	Glu	Gly	Asp	Asn	Ala 30	Thr	Phe
5	Thr	Cys	Ser 35	Phe	Ser	Asn	Thr	Ser 40	Glu	Ser	Phe	Val	Leu 45	Asn	Trp	Tyr
10	Arg	Met 50	Ser	Pro	Ser	Asn	Gln 55	Thr	Asp	Lys	Leu	Ala 60	Ala	Phe	Pro	Glu
	Asp 65	Arg	Ser	Gln	Pro	Gly 70	Gln	Asp	Cys	Arg	Phe 75	Arg	Val	Thr	Gln	Leu 80
15	Pro	Asn	Gly	Arg 85	Asp	Phe	His	Met	Ser	Val 90	Val	Arg	Ala	Arg 95	Arg	Asn
	Asp	Ser	Gly	Thr 100	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala 105	Ile	Ser	Leu	Ala	Pro 110	Lys	Ala
20	Gln	Ile	Lys 115	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala 120	Glu	Leu	Arg	Val	Thr 125	Glu	Arg	Arg
25	Ala	Glu 130	Val	Pro	Thr	Ala	His 135	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro	Arg 140	Pro	Ala	Gly
	Gln 145	Phe	Gln	Thr	Leu	Val 150										
30	<210>	70														
	<211>	288														
	<212>	ΠPT														
	<213>	homo sapiens														
35	<400>	70														
	Met 1	Gln	Ile	Pro	Gln 5	Ala	Pro	Trp	Pro	Val 10	Val	Trp	Ala	Val 15	Leu	Gln
40	Leu	Gly	Trp	Arg 20	Pro	Gly	Trp	Phe	Leu 25	Asp	Ser	Pro	Asp	Arg 30	Pro	Trp
	Asn	Pro	Pro 35	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala 40	Leu	Leu	Val	Val	Thr 45	Glu	Gly	Asp
45	Asn	Ala 50	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser 55	Phe	Ser	Asn	Thr	Ser 60	Glu	Ser	Phe	Val
50	Leu 65	Asn	Trp	Tyr	Arg	Met 70	Ser	Pro	Ser	Asn	Gln 75	Thr	Asp	Lys	Leu	Ala 80
	Ala	Phe	Pro	Glu	Asp 85	Arg	Ser	Gln	Pro	Gly 90	Gln	Asp	Cys	Arg	Phe 95	Arg
55	Val	Thr	Gln	Leu 100	Pro	Asn	Gly	Arg	Asp 105	Phe	His	Met	Ser	Val 110	Val	Arg
	Ala	Arg	Arg 115	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr 120	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala 125	Ile	Ser	Leu
60	Ala	Pro 130	Lys	Ala	Gln	Ile	Lys 135	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala 140	Glu	Leu	Arg	Val
65	Thr 145	Glu	Arg	Arg	Ala	Glu 150	Val	Pro	Thr	Ala	His 155	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro 160
	Arg	Pro	Ala	Gly	Gln 165	Phe	Gln	Thr	Leu	Val 170	Val	Gly	Val	Val	Gly 175	Gly
70	Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Val	Leu	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ala	Val	Ile	Cys

	180	185	190
	Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr	Ile Gly Ala Arg Arg Thr	Gly Gln Pro
	195	200	205
5	Leu Lys Glu Asp Pro Ser	Ala Val Pro Val Phe Ser	Val Asp Tyr Gly
	210	215	220
10	Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg	Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro	Val Pro
	225	230	235
	Cys Val Pro Glu Gln Thr	Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro	Ser Gly
	245	250	255
15	Met Gly Thr Ser Ser Pro	Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp	Gly Pro Arg
	260	265	270
	Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro	Glu Asp Gly His Cys Ser	Trp Pro Leu
	275	280	285
20	<210> 71		
	<211> 4		
	<212> ПРТ		
	<213> Штучна		
25	<220>		
	<223> Мінімальна HVR1 PD1-0103 і гуманізованого варіанта PD1-0103: PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 і PD1-0103-0315		
30	<400> 71		
	Ser Ser Tyr Thr		
	1		
35	<210> 72		
	<211> 8		
	<212> ПРТ		
	<213> Штучна		
40	<220>		
	<223> Мінімальна HVR2 PD1-0103 і гуманізованого варіанта PD1-0103: PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 і PD1-0103-0315		
	<400> 72		
45	Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr		
	1 5		
	<210> 73		
50	<211> 5		
	<212> ПРТ		
	<213> Штучна		
	<220>		
55	<223> Мінімальна HVR3 PD1-0103 і гуманізованого варіанта PD1-0103: PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 і PD1-0103-0315		
	<400> 73		
60	Gly Arg Val Tyr Phe		
	1 5		
	<210> 74		
	<211> 6		
65	<212> ПРТ		
	<213> Штучна		
	<220>		
70	<223> Мінімальна LVR1 PD1-0103 і гуманізованого варіанта PD1-0103: PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 і PD1-0103-0315		

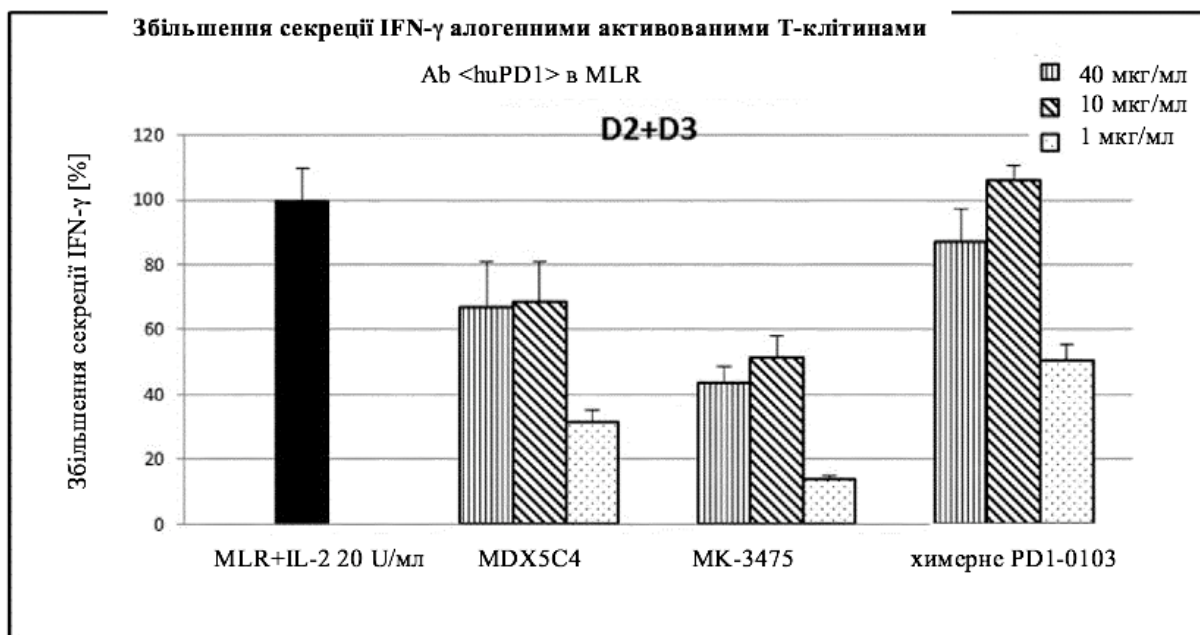
5 <400> 74  
 Thr Ser Asp Asn Ser Phe  
 1 5  
 <210> 75  
 <211> 7  
 <212> ПРТ  
 10 <213> Штучна  
 <220>  
 <223> мінімальна LVR2 PD1-0103 і гуманізованого варіанта PD1-0103:  
 PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 і PD1-0103-0315  
 15 <400> 75  
 Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser  
 1 5  
 20 <210> 76  
 <211> 6  
 <212> ПРТ  
 <213> Штучна  
 25 <220>  
 <223> мінімальна LVR3 PD1-0103 і гуманізованого варіанта PD1-0103:  
 PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 і PD1-0103-0315  
 30 <400> 76  
 Asn Tyr Asp Val Pro Trp  
 1 5  
 35 <210> 77  
 <211> 3  
 <212> ПРТ  
 <213> Штучна  
 40 <220>  
 <223> фрагмент FR-H3, що містить амінокислотну послідовність RDN в  
 положеннях 71, 72, 73 згідно з нумерацією Kabat  
 45 <400> 77  
 Arg Asp Asn  
 1

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

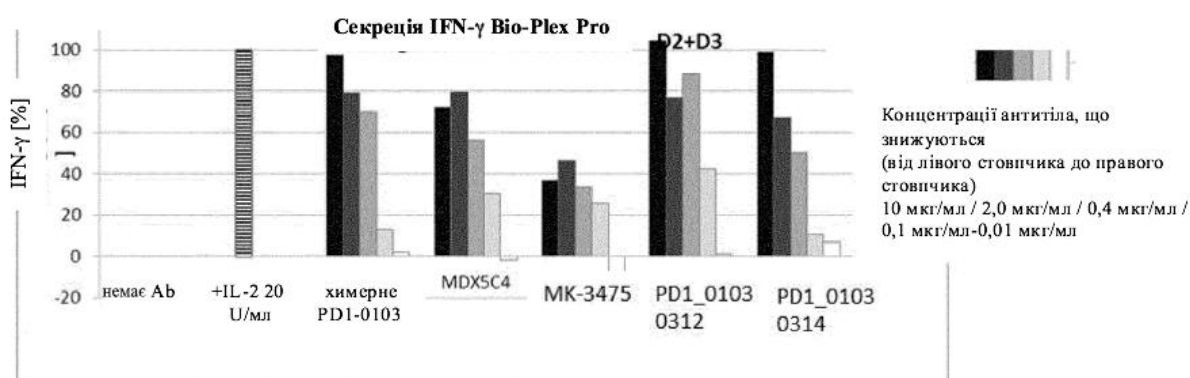
- 50 1. Виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з людським PD1, де дане антитіло містить:
- (а) HVR-H1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:71;
  - (б) HVR-H2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:72;
  - (в) HVR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:73;
  - 55 (г) HVR-L1, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:74;
  - (д) HVR-L2, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:75;
  - (е) HVR-L3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:76, і
  - (ж) FR-H3, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:77 (RDN) в положеннях 71, 72 і 73, згідно з нумерацією Kabat.
- 60 2. Антитіло за п. 1, де дане антитіло
- А)
  - i) містить послідовність VH SEQ ID NO:7 і послідовність VL SEQ ID NO:8;
  - ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i);
  - або
  - 65 Б)
  - i) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:58;



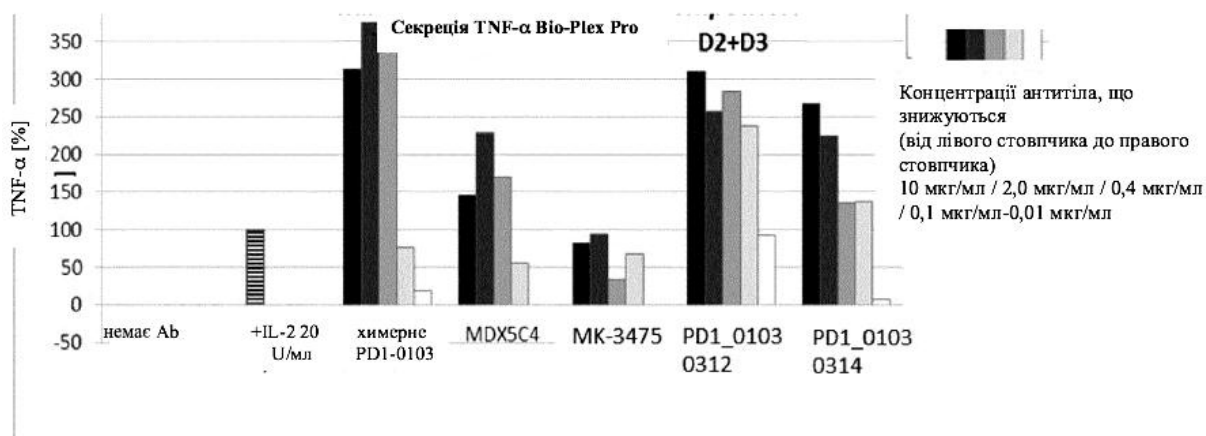
- ii) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:59;
  - iii) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:60;
  - iv) містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:61.
3. Виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з людським PD1, де дане антитіло
- 5 i) містить послідовність VH SEQ ID NO:7 і послідовність VL SEQ ID NO:8;  
 ii) або гуманізований варіант VH і VL антитіла згідно з i).
4. Виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з людським PD1, де дане антитіло містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:58.
- 10 5. Виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з людським PD1, де дане антитіло містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:59.
6. Виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з людським PD1, де дане антитіло містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:60.
7. Виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з людським PD1, де дане антитіло містить послідовність VH SEQ ID NO:57 і послідовність VL SEQ ID NO:61.
- 15 8. Антитіло до PD1 за будь-яким з пп. 1-7, де дане антитіло характеризується незалежно одною або більше ніж одною з наступних властивостей: антитіло до PD1  
 i) конкурує за зв'язування з PD-1 з антитілом до PD1, яке містить VH з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:7 і VL з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:8, i/або  
 ii) зв'язується з PD-1 людини і яванського макака; i/або  
 20 iii) посилює секрецію інтерферону-гамма (IFN-гамма) алогенними стимульованими Т-клітинами на 85 % або більше при концентрації антитіла 10 мкг/мл; i/або  
 iv) посилює секрецію фактора некрозу пухлин альфа (TNF альфа) алогенними стимульованими Т-клітинами на 200 % або більше при концентрації антитіла 10 мкг/мл.
9. Антитіло за будь-яким з пп. 1-8, яке являє собою повнорозмірне антитіло IgG1 з мутаціями L234A, L235A і P329G (нумерація згідно з індексом EU за Kabat).
- 25 10. Виділена нуклеїнова кислота, кодує антитіло, що специфічно зв'язується з людським PD1, за будь-яким з пп. 1-9.
11. Клітина-хазяїн для експресії антитіла за будь-яким з пп. 1-9, яка містить нуклеїнову кислоту за п. 10.
- 30 12. Спосіб одержання антитіла за будь-яким з пп. 1-9, що включає культивування клітини-хазяїна за п. 11 таким чином, що продукується антитіло.
13. Спосіб за п. 12, який додатково включає виділення антитіла з клітини-хазяїна.
14. Фармацевтичний препарат для специфічного зв'язування з людським PD1, який містить антитіло за будь-яким з пп. 1-8 і фармацевтично прийнятний носій.
- 35 15. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 1-8 для лікування раку, експресуючого PD1.
16. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 1-8 в приготуванні лікарського засобу для лікування раку, експресуючого PD1.



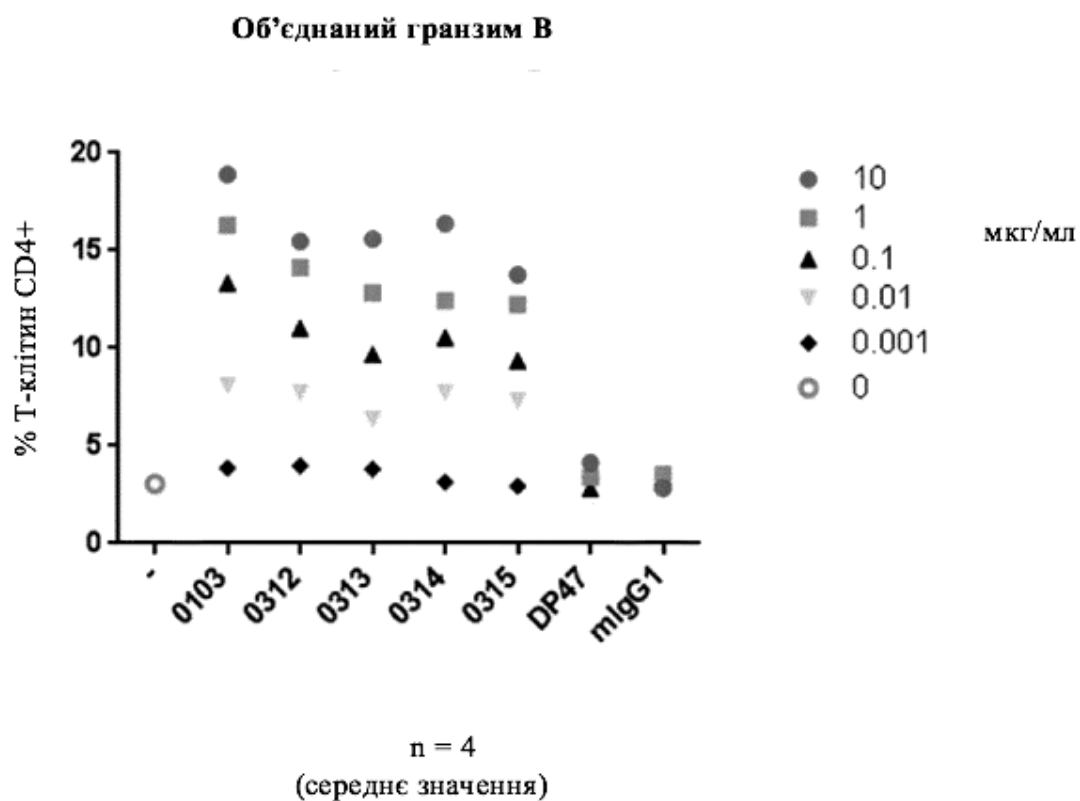
Фіг. 1



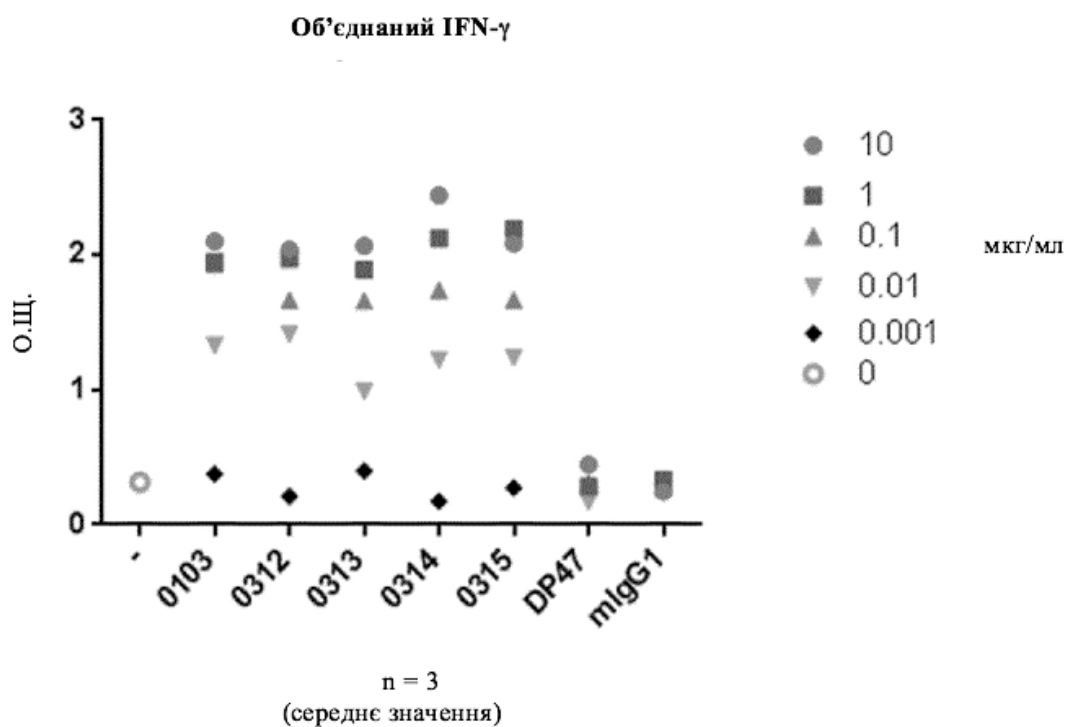
Фіг. 2



Фіг. 3



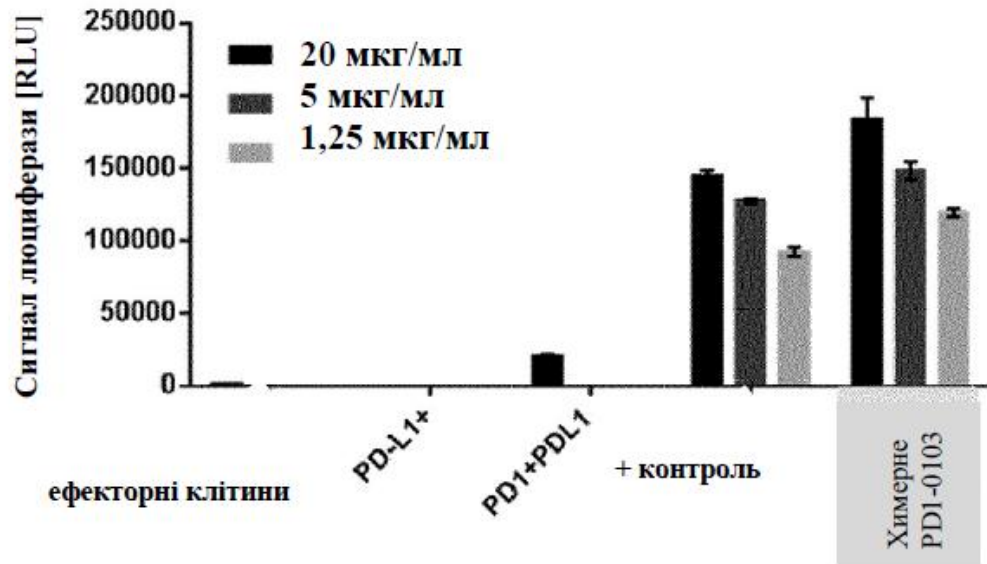
**Фіг. 4А**



**Фіг. 4В**

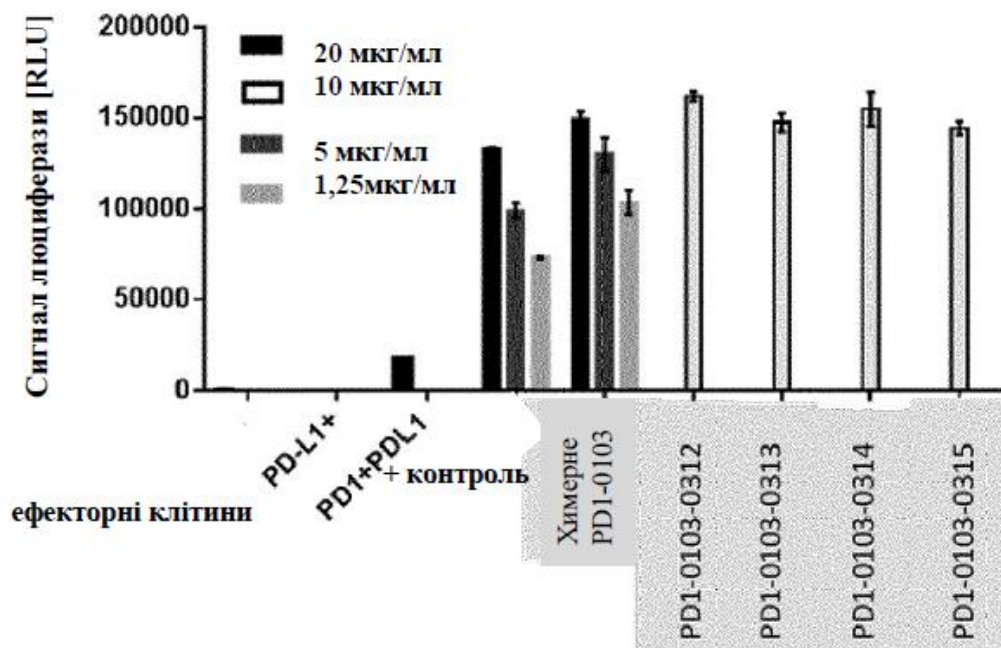
5A

**(1) Вплив блокади PD1/PD-L1 на повторну активацію пригніченої сигналізації TCR**

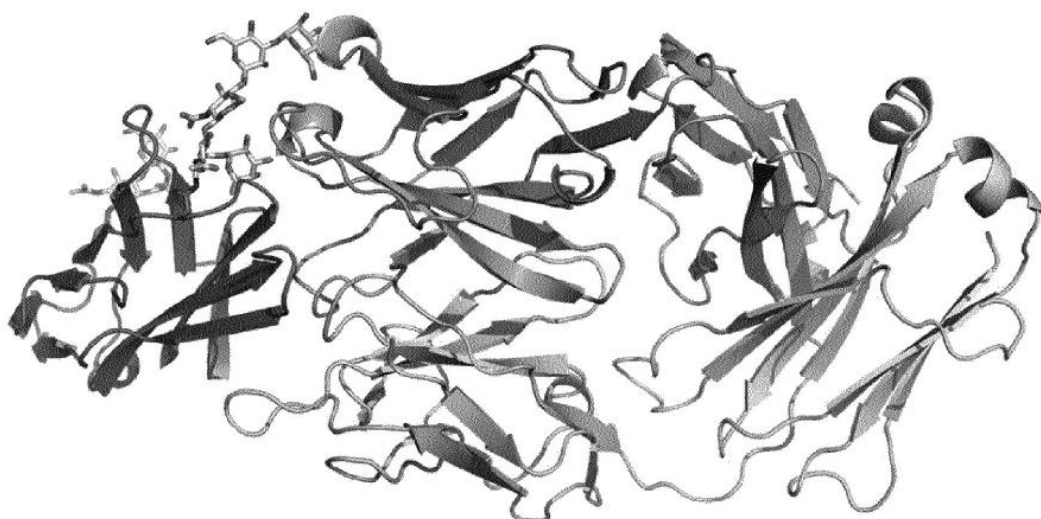


5B

**(2) Вплив блокади PD1/PD-L1 на повторну активацію пригніченої сигналізації TCR**



Фіг. 5A і 5B

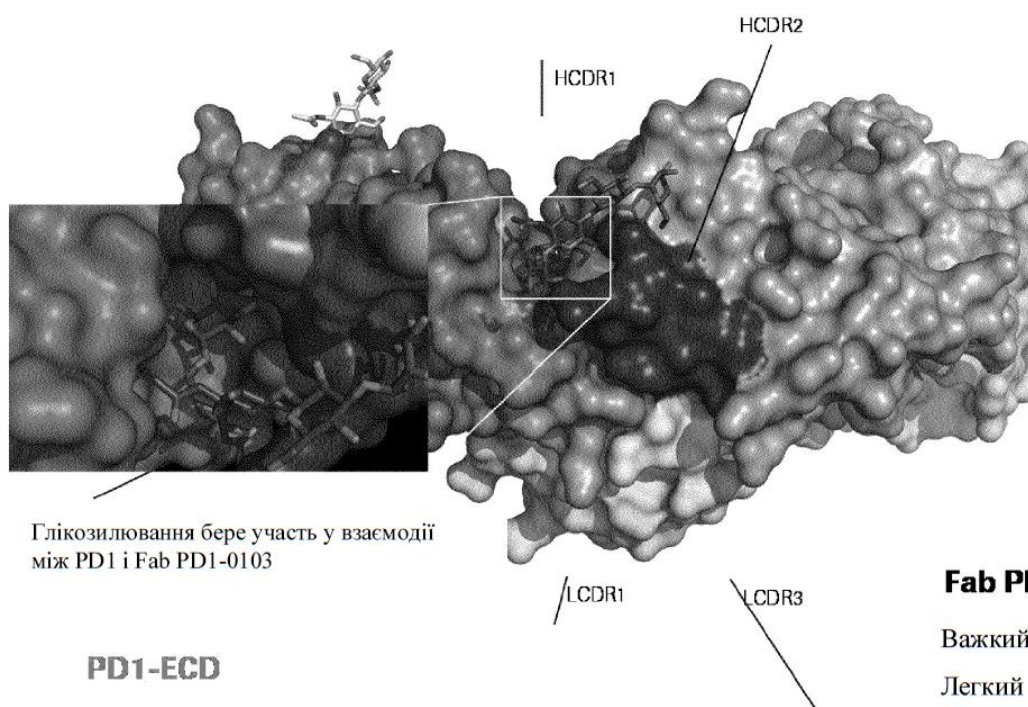


**PD1-ECD**

**Fab PD1-0103**

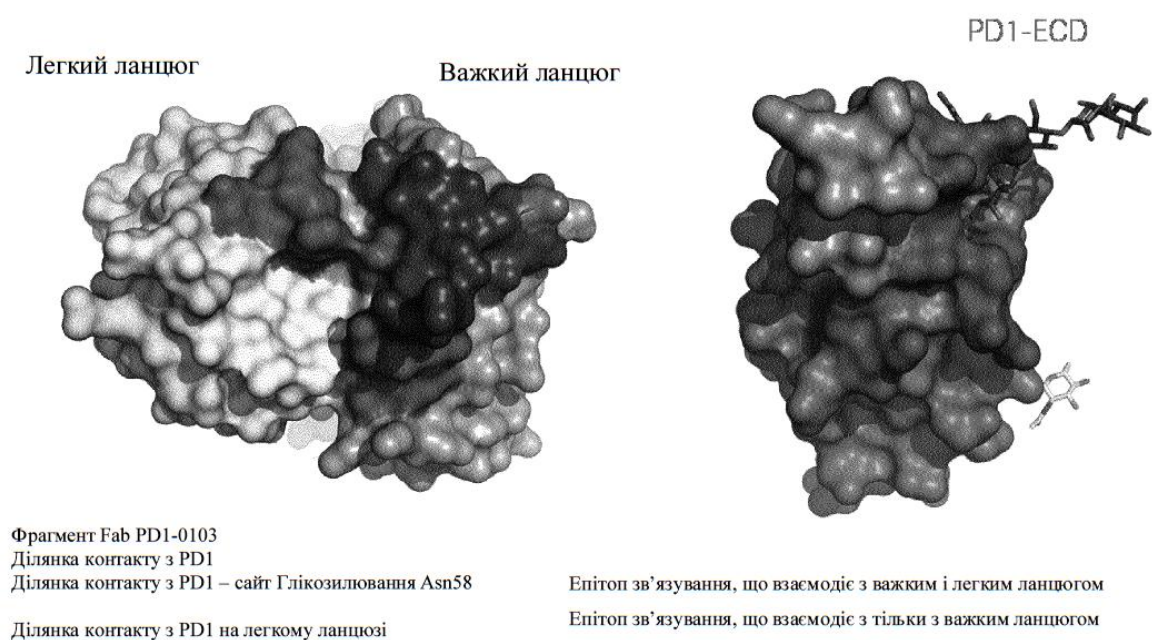
Важкий ланцюг  
Легкий ланцюг

**Fig. 6**

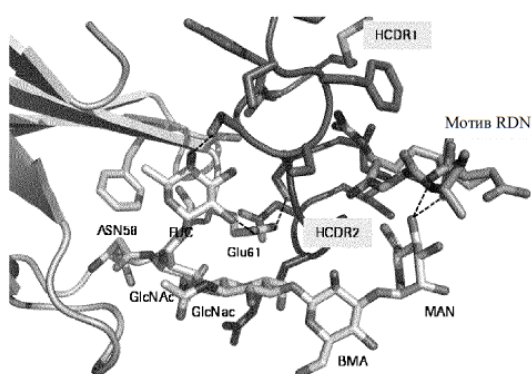


**Fig. 7**





Фіг. 8



PD1- Глікозилювання на Asn58 (центральный цукровий ланцюг)	HC
Перший GlcNAc	Arg56, Asp57
FUC	Ser30, Ser31, Tyr32, Gly53, Gly54,
Другий GlcNAc	Gly54, Gly55, Arg56
BMA	Gly54, Asn74
MAN	Gly53, Gly54, Gly55, Arg72, Asp73, Asn74

[GlcNAc] = NGA = N-ацетил-бета-D-галактозамін = 2-(ацетиламіно)-2-дезоксид-бета-D-галактопіраноза

[FUC] = альфа-L-фукоза

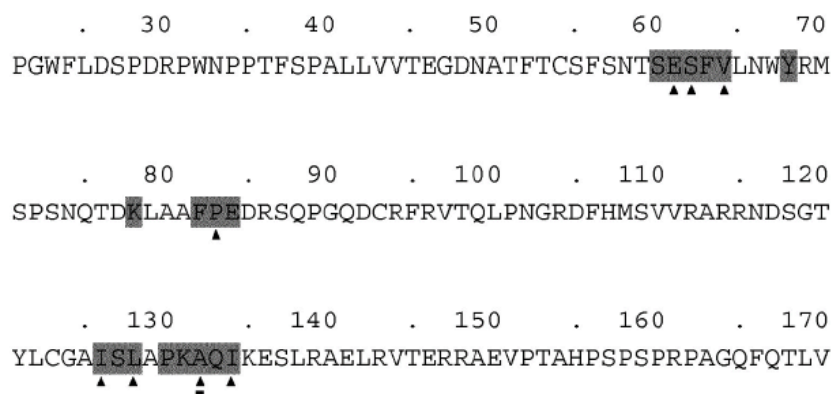
[BMA] = бета-D-манопіраноза

[MAN] = альфа-D-манопіраноза

Фіг. 9

- Контакти, розраховані PISA
- Сирій: залишки PD-1 в контакті з антигілом

➤ PD1

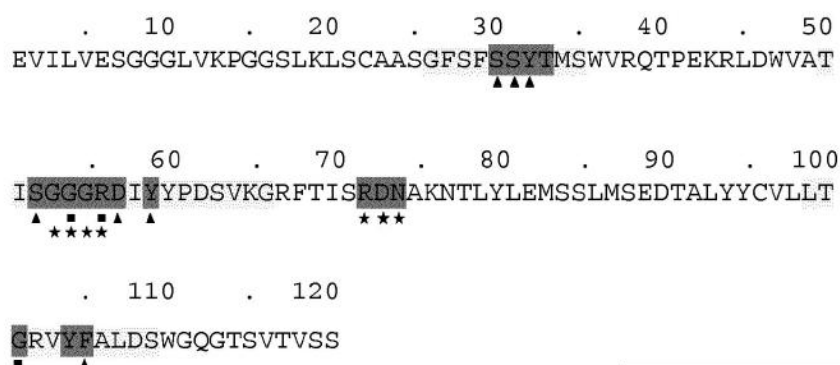


- ▲ = взаємодія з боковим ланцюгом
- = взаємодія з головним ланцюгом

Fig. 10

- Жовтий: CDR
- Червоний: залишки антитіла в контакті з антигеном
- Контакти, розраховані PISA

➤ PD1-0103 HC



- ★ = взаємодія з глікозилуванням
- ▲ = взаємодія з боковим ланцюгом
- = взаємодія з головним ланцюгом

Fig. 11

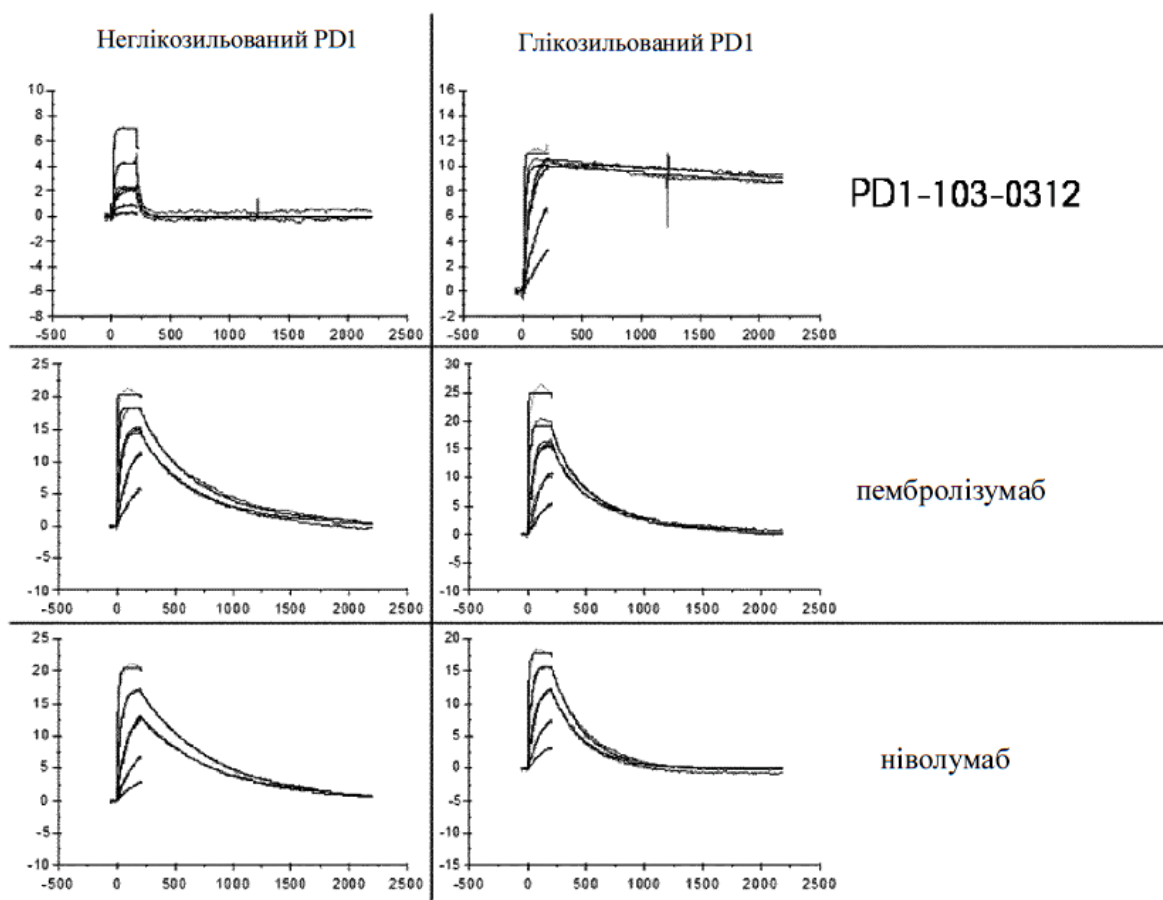
- Жовтий: CDR
- Червоний: залишки антитіла в контакт з антигеном
- Контакти, розраховані PISA

➤ PD1-0103\_LC

. 10 . 20 . 30 . 40 . 50  
 KIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASESVDTSNSEIHWYQQRPGQSPKL  
 . 60 . 70 . 80 . 90 . 100  
 LIYRSSTLESQVPAFSGSGSRRTDFTLTIDPVEADDVATYYCQONYDVPW  
 . 110  
 TFGGGTKLEIK

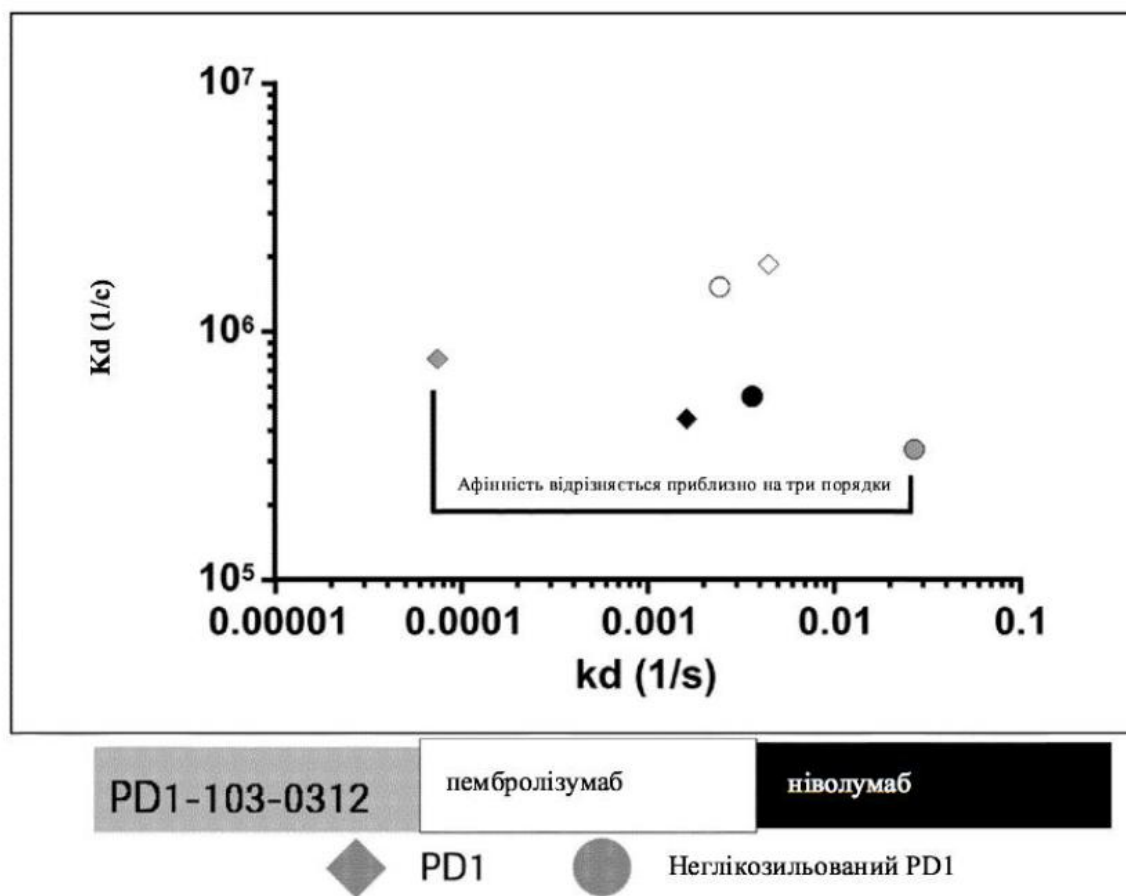
▲ = взаємодія з боковим ланцюгом  
 ■ = взаємодія з головним ланцюгом

Фіг. 12

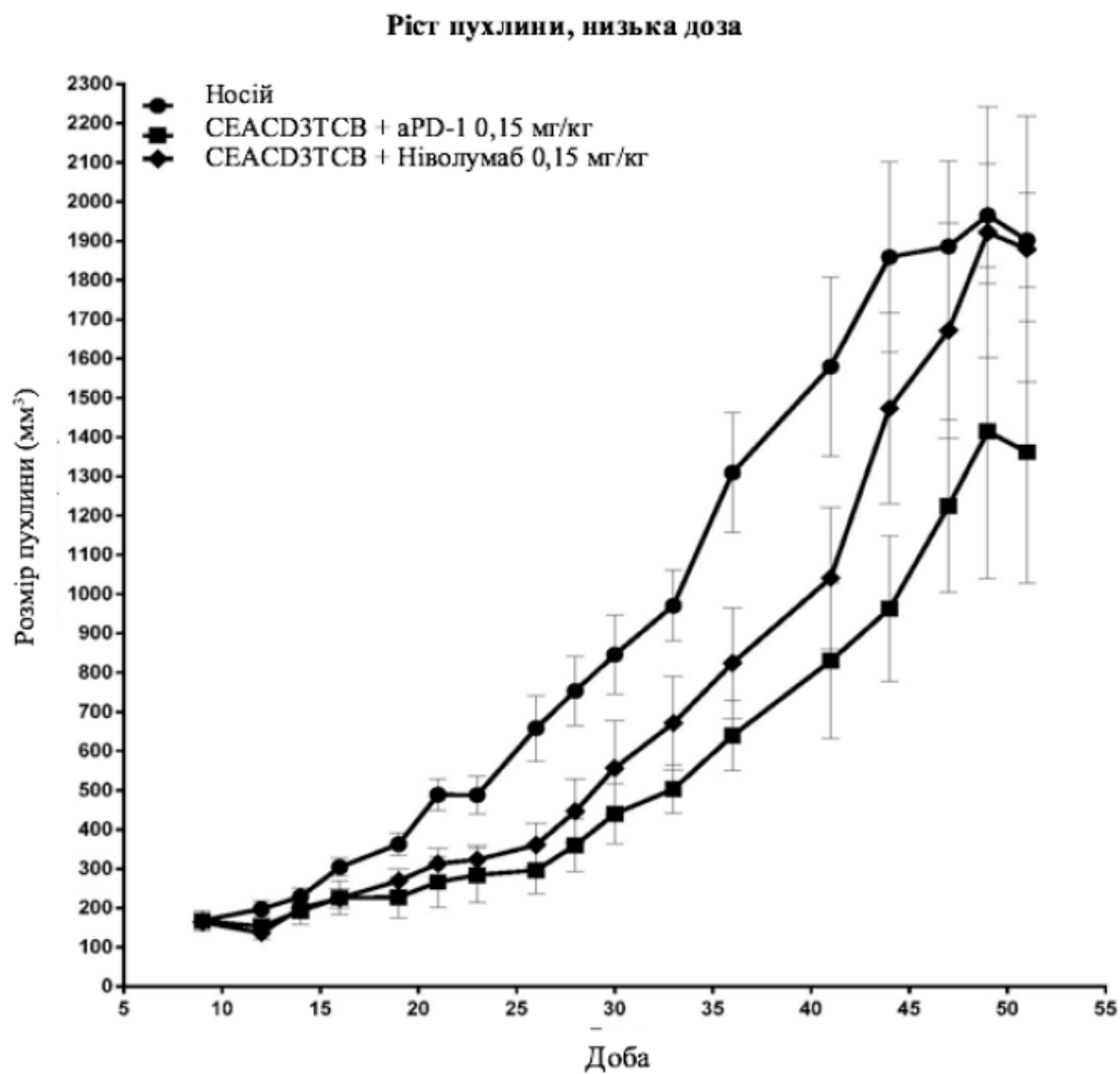


Фіг. 13А



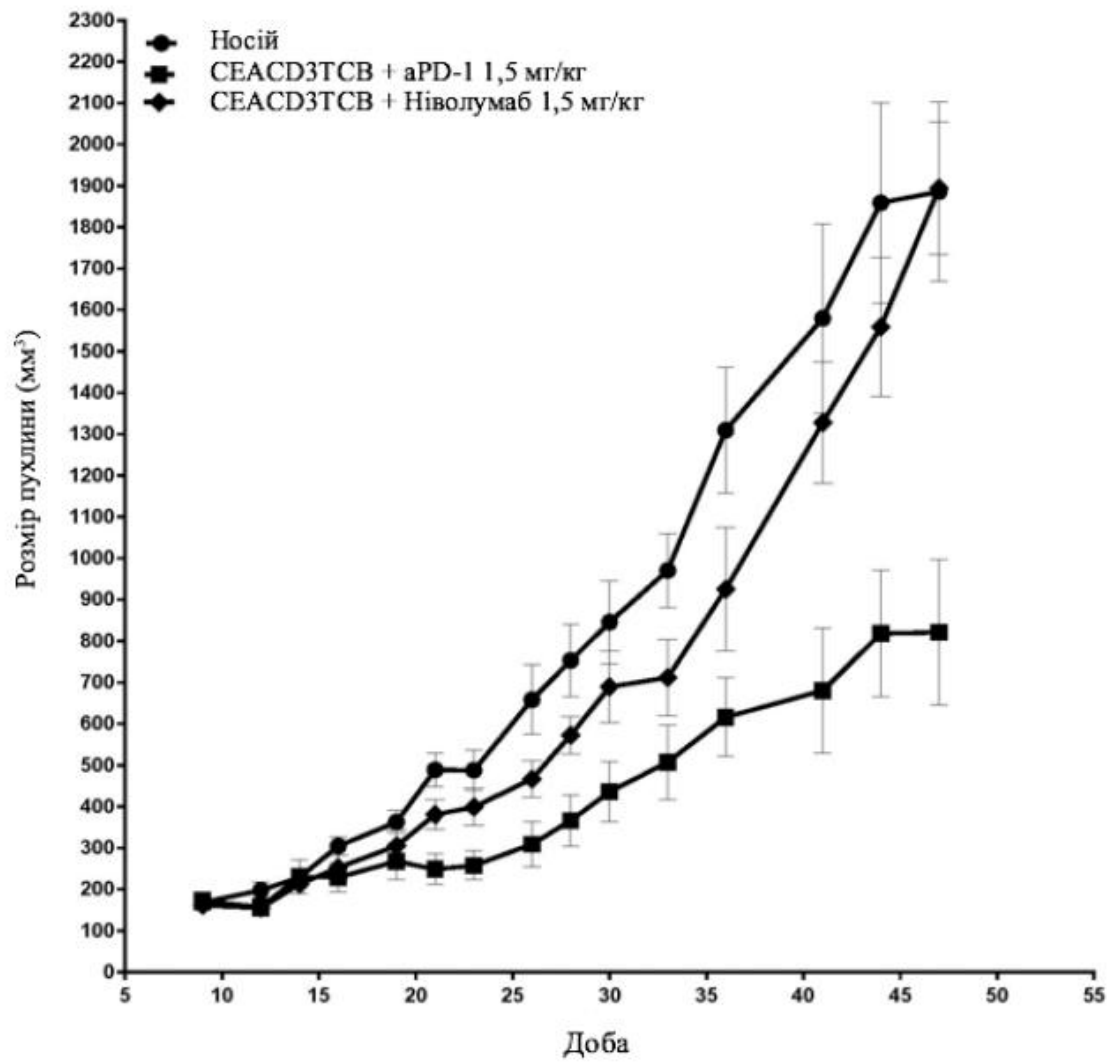


Фіг. 13В



Фіг. 14А

**Ріст пухлини, висока доза**



**Фіг. 14В**