

TITOLO: Anticorpo PD-1, frammento legante l'antigene dello stesso e applicazione medica dello stesso.

DESCRIZIONE

**CAMPO DELL'INVENZIONE**

5 La presente invenzione riguarda un anticorpo PD-1, un frammento legante l'antigene PD-1, un anticorpo chimerico e anticorpi umanizzati comprendenti il CDR dell'anticorpo PD-1, nonché una composizione farmaceutica comprendente l'anticorpo PD-1 e il suo frammento legante l'antigene, così come  
10 il suo uso come farmaco antitumorale.

**ANTEFATTO DELL'INVENZIONE**

L'immunoterapia tumorale è un punto caldo nell'area terapeutica tumorale per lungo tempo, l'immunoterapia oncologica associata alle cellule T è nella posizione centrale.  
15 L'immunoterapia tumorale colpisce i tumori utilizzando e mobilizzando completamente i linfociti T citotossici nei pazienti con tumori; può essere il modo più efficace e sicuro per il trattamento del cancro. Allo stesso tempo, la fuga del tumore è un enorme ostacolo all'immunoterapia tu-  
20 morale, in cui le cellule tumorali favoriscono la rapida crescita del tumore attraverso il suo effetto inibitorio sul sistema immunitario.

C'è una relazione estremamente complessa tra il meccanismo di fuga immunitaria del tumore e la risposta immunitaria  
25 del corpo ai tumori. Nelle fasi iniziali dell'immunoterapia

*Handwritten signature*

- tumorale, le cellule T killer specifiche del tumore hanno attività biologica, ma perdono la funzione di uccisione nella fase avanzata della crescita tumorale. Quindi l'immunoterapia tumorale è per migliorare al massimo la risposta
- 5 del sistema immunitario del paziente al tumore. La chiave dell'immunoterapia tumorale non è solo attivare la risposta del sistema immunitario esistente, ma anche mantenere la durata e l'intensità della risposta del sistema immunitario.
- 10 L'attivazione umana delle cellule T in vivo è implementata da un sistema a due vie di segnalazione che non solo deve presentare un peptide MHC-antigene attraverso cellule T presenti nell'antigene per fornire un primo segnale, ma richiede anche una serie di molecole costimolatorie per for-
- 15 nire un secondo segnale, e poi le cellule T mostrano una normale risposta immunitaria. Questo sistema di doppia segnalazione svolge un ruolo vitale per l'equilibrio del sistema immunitario e regola rigorosamente le diverse risposte immunitarie stimulate da antigeni endogeni ed esogeni.
- 20 L'assenza di un secondo segnale fornito da molecole costimolatorie non darà luogo ad una risposta o ad una risposta immunitaria specifica sostenuta delle cellule T, con conseguente tolleranza. Pertanto, il secondo percorso del segnale svolge un ruolo regolatore chiave nell'intero pro-
- 25 cesso di risposta immunitaria.

*Paulo Naranjo*

Programmed death-1 (PD-1), trovato nel 1992, è un recettore proteico espresso in superficie cellulare T, ed è coinvolto nell'apoptosi cellulare. Il PD-1 appartiene alla famiglia dei CD28, presenta il 23% di omologia in sequenza amminoacidica con antigene T linfocita citotossico 4 (CTLA-4), ma è espresso principalmente in cellule T attivate, cellule B e cellule mieloidi, che è diverso dal CTLA. PD-1 ha due ligandi, PD-L1 e PD-L2 rispettivamente. PD-L1 è principalmente espresso in cellule T, cellule B, macrofagi, e cellule dendritiche (DC), e l'espressione è regolata nelle cellule attivate. L'espressione di PD-L2 è principalmente limitata alle cellule presentanti antigene, come i macrofagi attivati e le cellule dendritiche.

Nuovi studi hanno rilevato un'alta espressione della proteina PD-L1 nei tessuti tumorali umani come il cancro al seno, cancro ai polmoni, cancro allo stomaco, cancro intestinale, cancro renale, melanoma e altri, e i livelli di espressione del PD-L1 è strettamente correlato alle condizioni cliniche e alla prognosi dei pazienti. Per PD-L1 inibisce la proliferazione delle cellule T attraverso la seconda via di segnalazione, bloccando il legame di PD-L1/PD-1 diventa un obiettivo molto promettente nel campo dell'immunoterapia tumorale.

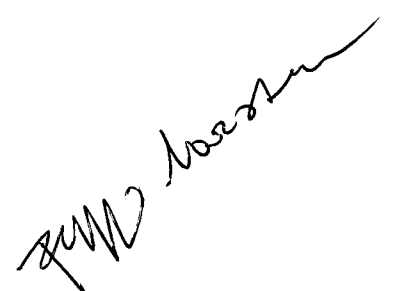
WO 2011/110621 descrive un anticorpo agonistico umanizzato legante il PD-1 umano, i suoi usi terapeutici, le composi-

*Handwritten signature: P. M. N. Rosen*

zioni e i metodi per produrre detto anticorpo. WO 2008/156712 descrive gli anticorpi che bloccano il legame del recettore di morte programmata umano (hPD-1) ai suoi ligandi (hPD-1-L1 o hPD-1-L2) e le loro sequenze a regione  
5 variabile così come un metodo per aumentare l'attività (o ridurre la downmodulation) di una risposta immunitaria attraverso la via PD-1. Melero et al. (2013) Clin Cancer Res 19(5): 997-1008 riporta studi clinici con diversi mAb anti-PD-1 per il trattamento dei tumori.

10 Attualmente, ci sono diverse società farmaceutiche multinazionali impegnate in anticorpi monoclonali contro il PD-1, che massimizzano la risposta autoimmunitaria dei pazienti contro il tumore bloccando il legame di PD-L1/PD-1, e raggiungono in sequenza lo scopo di uccidere le cellule tumorali,  
15 come ad esempio WO2009114335. Nei risultati clinici degli anticorpi monoclonali PD-1 di BMS e Merck, sono stati osservati alcuni tassi di risposta nei tumori polmonari in cellule non-piccole, nel melanoma e nel carcinoma renale, e il tasso di risposta ha mostrato un'elevata rilevanza con  
20 l'espressione di PD-L1 nei tumori, il che ha suggerito che l'anticorpo PD-1 esercita un effetto positivo sui tumori. La presente invenzione fornisce un anticorpo PD-1 con elevata affinità, elevata selettività ed elevata attività biologica.

25 **RIASSUNTO DELL'INVENZIONE**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. M. ...', is located in the bottom right corner of the page.

La presente invenzione fornisce un anticorpo PD-1 o un suo frammento legante l'antigene, comprendente:

una catena leggera a regione variabile comprendente un LCDR1, un LCDR2 e un LCDR3 come mostrato in SEQ ID NO: 6,  
5 SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8, rispettivamente; e

una catena pesante a regione variabile comprendente un HCDR1, un HCDR2 e un HCDR3 come mostrato in SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 5.

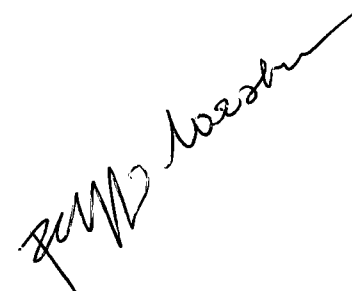
Sono inoltre forniti una molecola di DNA codificante l'anticorpo,  
10 un vettore di espressione comprendente la molecola di DNA, una cellula ospite trasformata con il vettore di espressione, una composizione farmaceutica comprendente l'anticorpo PD-1 o il frammento legante l'antigene e gli usi medici dell'anticorpo PD-1 o del frammento legante  
15 l'antigene e della composizione farmaceutica.

In questo contesto, viene descritto un anticorpo PD-1 o un suo frammento legante l'antigene, comprendente:

una regione variabile a catena leggera comprendente almeno un LCDR selezionato tra le sequenze indicate come mostrato  
20 in SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o N. ID. SEQ.: 8; e

una regione variabile a catena pesante comprendente almeno un HCDR selezionato tra queste sequenze, come indicato in SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o N. ID. SEQ.: 5.

In questo contesto, viene descritto un anticorpo PD-1 o un  
25 suo frammento legante l'antigene, in cui la regione varia-

A handwritten signature in black ink, located in the bottom right corner of the page. The signature is cursive and appears to read "F. M. ...".

bile della catena leggera comprende un LCDR1 come mostrato in SEQ ID NO: 6.

In questo contesto, viene descritto un anticorpo PD-1 o un suo frammento legante l'antigene, in cui la regione varia-  
5 bile della catena leggera comprende un LCDR2 come mostrato in SEQ ID NO: 7.

In questo contesto, viene descritto un anticorpo PD-1 o un suo frammento legante l'antigene, in cui la regione varia-  
bile della catena leggera comprende un LCDR3 come mostrato  
10 in SEQ ID NO: 8.

In questo contesto, viene descritto un anticorpo PD-1 o un suo frammento legante l'antigene, in cui la regione varia-  
bile della catena pesante comprende un HCDR1 come mostrato in SEQ ID NO: 3.

15 In questo contesto, viene descritto un anticorpo PD-1 o un suo frammento legante l'antigene, in cui la regione varia-  
bile della catena pesante comprende un HCDR2 come mostrato in SEQ ID NO: 4.

In questo contesto, viene descritto un anticorpo PD-1 o un  
20 suo frammento legante l'antigene, in cui la regione varia-  
bile della catena pesante comprende un HCDR3 come mostrato in SEQ ID NO: 5.

In questo contesto, viene descritto un anticorpo PD-1 o un suo frammento legante l'antigene, in cui la regione varia-  
25 bile della catena leggera comprende un LCDR1, un LCDR2 e un

*Handwritten signature*

LCDR3 come mostrato in SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8.

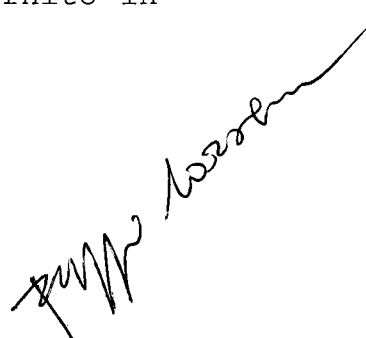
In questo contesto, viene descritto un anticorpo PD-1 o un suo frammento legante l'antigene, in cui la regione variabile a catena pesante comprende un HCDR1, un HCDR2 e un HCDR3 come mostrato in SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 5.

A condizione che si tratti di un anticorpo PD-1 o di un suo frammento legante l'antigene, in cui la regione variabile della catena leggera comprende un LCDR1, un LCDR2 e un LCDR3 come mostrato in SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8, rispettivamente; e in cui la regione variabile della catena pesante comprende un HCDR1, un HCDR2 e un HCDR3 come mostrato in SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 5.

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, secondo l'anticorpo PD-1 o il suo frammento legante l'antigene fornito in questo contesto, l'anticorpo è un anticorpo murino o un frammento di esso.

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, secondo l'anticorpo murino o il frammento di esso previsto nel presente documento, la regione variabile della catena leggera comprende inoltre la catena leggera FR murina  $\kappa$ ,  $\lambda$  o una sua variante.

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, l'anticorpo murino o il suo frammento fornito in

A handwritten signature in black ink, located in the bottom right corner of the page. The signature is cursive and appears to read 'Tommaso Lorenzini'.

questo contesto comprende inoltre una costante regione a catena leggera murina  $\kappa$ ,  $\lambda$  o una variante della stessa.

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, secondo l'anticorpo murino o il frammento di esso

5 fornito nel presente documento, la regione variabile a catena pesante comprende inoltre la catena pesante FR di IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 murino o una variante di questa.

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, l'anticorpo murino o il suo frammento fornito in

10 questo contesto comprende inoltre una regione a catena pesante costante di IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 murino o una variante di questa.

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, secondo il frammento di anticorpo PD-1 o di legame con l'antigene fornito in questo contesto, l'anticorpo è

15 un anticorpo chimerico o un suo frammento.

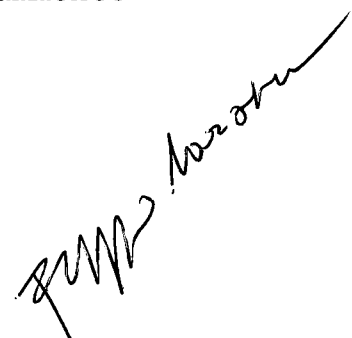
In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, secondo l'anticorpo chimerico PD-1 o il suo frammento fornito in questo contesto, la sequenza di regione

20 variabile a catena leggera dell'anticorpo chimerico è SEQ ID NO: 10, e

la sequenza di anticorpi chimerici a catena pesante a regione variabile è SEQ ID NO: 9.

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, l'anticorpo chimerico PD-1 o il suo frammento

25

A handwritten signature in black ink, located in the bottom right corner of the page. The signature is cursive and appears to read "F. M. M. L. 10/20/04".

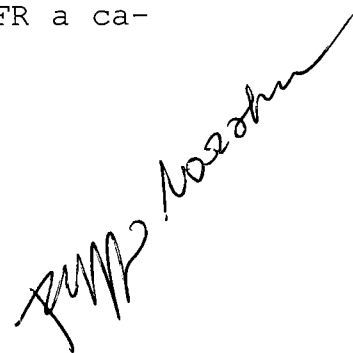
fornito in questo contesto comprende inoltre una regione leggera catena costante della catena umana  $\kappa$ ,  $\lambda$  o una variante della stessa.

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, l'anticorpo chimerico PD-1 o il suo frammento fornito in questo contesto comprende inoltre una regione a catena costante pesante di IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 umana o una variante della stessa, preferibilmente comprende una regione a catena costante pesante di IgG2 o IgG4 umana, o quella di IgG1 che non ha ADCC (citotossicità mediata da cellule dipendente da anticorpi) dopo mutazione aminoacidica.

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, secondo l'anticorpo PD-1 o il frammento legante l'antigene fornito in questo contesto, l'anticorpo è un anticorpo umanizzato.

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, secondo l'anticorpo umanizzato PD-1 o il suo frammento fornito in questo contesto, la regione variabile della catena leggera dell'anticorpo umanizzato comprende anche la catena leggera FR della catena umana  $\kappa$ , catena  $\lambda$  o una variante della stessa.

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, secondo l'anticorpo umanizzato PD-1 o il suo frammento fornito in questo contesto, la sequenza FR a ca-

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'PMP 1020h', is located in the bottom right corner of the page.

tena leggera della regione variabile a catena leggera dell'anticorpo umanizzato è derivata da una sequenza di combinazione di catene leggere di linea germinale umana IGKV1-39 e JK4 come mostrato in SEQ ID NO: 14, comprendente

5 FR1, FR2 e FR3 di IGKV 1-39 e FR4 di JK4.

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, secondo l'anticorpo umanizzato PD-1 o il suo frammento fornito in questo contesto, la sequenza della catena leggera dell'anticorpo umanizzato è mostrata in SEQ ID

10 NO: 12, o una variante dello stesso.

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, secondo l'anticorpo umanizzato PD-1 o il suo frammento fornito in questo contesto, la variante della regione variabile della catena leggera dell'anticorpo umanizzato comprende una mutazione di amminoacido 0-10 nella regione variabile della catena leggera, preferibilmente A43S.

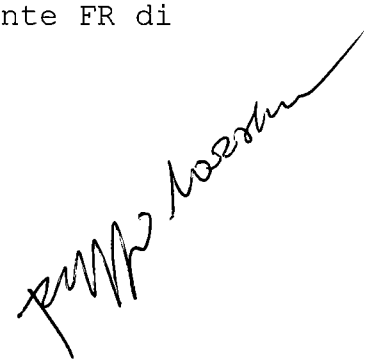
15

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, l'anticorpo umanizzato PD-1 o il suo frammento fornito in questo contesto comprende inoltre una regione

20 leggera catena costante di catena umana  $\kappa$ ,  $\lambda$  o una loro variante.

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, secondo l'anticorpo umanizzato PD-1 o il suo frammento fornito in questo contesto, la regione variabile

25 a catena pesante comprende inoltre una catena pesante FR di

A handwritten signature in black ink, located in the bottom right corner of the page. The signature is cursive and appears to read 'P. M. ...'.

IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 umano, o una variante della stessa.  
In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, secondo l'anticorpo umanizzato PD-1 o un suo frammento fornito in questo contesto, la sequenza FR a catena pesante della regione variabile a catena pesante dell'anticorpo umanizzato deriva da una sequenza combinata di catene pesanti di linea germinale umane IgHV3-7 e JH6 come mostrato in SEQ ID NO: 13, di cui FR1, FR2 e FR3 di IgHV3-7 e FR4 di JH6.

10 In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, secondo l'anticorpo umanizzato PD-1 o il suo frammento fornito in questo contesto, la sequenza della catena pesante dell'anticorpo umanizzato è mostrata in SEQ ID NO: 11 o una variante della stessa; in cui la variante comprende preferibilmente una mutazione amminoacidica 0-10  
15 nella regione variabile a catena pesante, più preferibilmente G44R.

In una forma di realizzazione preferenziale della presente invenzione, l'anticorpo umanizzato PD-1 o il suo frammento  
20 fornito in questo contesto comprende inoltre una regione a catena costante pesante di IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 umano o una loro variante, e comprende preferibilmente una regione a catena costante pesante di IgG2 o IgG4 umane che non ha ADCC, o quella di IgG1 che non ha ADCC (citotossicità cellulo-mediata dipendente da anticorpi) dopo mutazione ami-  
25

noacidica. La variante è preferibilmente una mutazione a catena pesante costante della regione che causa attenuazione o carenza di ADCC, e più preferibilmente N297A, L234A, L235A di IgG1, IgG2/4 chimera, e F235E o L234A/E235A di  
5 IgG4.

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, secondo l'anticorpo PD-1 o il frammento legante l'antigene fornito in questo contesto, il frammento legante l'antigene è Fab, Fv, sFv o F(ab')<sub>2</sub>.

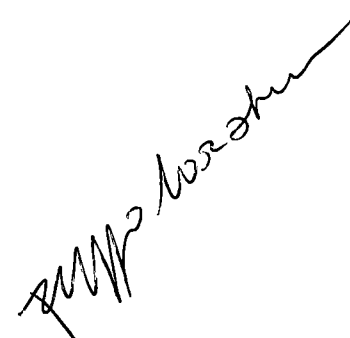
10 La presente invenzione fornisce inoltre una molecola di DNA codificante l'anticorpo PD-1 o il frammento legante l'antigene descritto sopra.

La presente invenzione fornisce inoltre un vettore di espressione comprendente la molecola di DNA come sopra descritto.  
15

La presente invenzione fornisce inoltre una cellula ospite trasformata con il vettore di espressione come sopra descritto.

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, secondo la cellula ospite fornita in questo contesto, la cellula ospite è costituita da batteri, preferibilmente *E. coli*.  
20

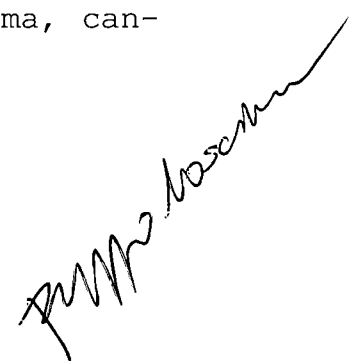
In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, la cellula ospite fornita in questo contesto è il  
25 lievito, preferibilmente *Pichia pastoris*.



La presente descrizione fornisce inoltre una composizione farmaceutica che comprende l'anticorpo PD-1 o il suo frammento legante l'antigene come descritto nel presente documento e un eccipiente, diluente o vettore farmaceuticamente  
5 accettabile.

La presente invenzione prevede inoltre l'uso dell'anticorpo PD-1 di cui sopra o del frammento legante l'antigene, o la composizione farmaceutica che lo contiene, per il trattamento del cancro, preferibilmente cancro esprimente PD-L1;  
10 e il cancro è preferibilmente cancro al seno, cancro al polmone, cancro allo stomaco, cancro intestinale, cancro renale, melanoma, e più preferibilmente cancro del polmone non a piccole cellule, melanoma e cancro renale.

La presente descrizione fornisce inoltre un anticorpo PD-1  
15 o il frammento legante l'antigene, o la composizione farmaceutica che lo contiene per l'uso nel trattamento e nella prevenzione della malattia o del disturbo mediato dal PD-1, comprendente la somministrazione ad un soggetto che ne ha bisogno di una quantità terapeuticamente efficace dell'an-  
20 ticorpo PD-1 o del frammento legante l'antigene a seconda dell'invenzione, o la composizione farmaceutica che lo comprende; in cui la malattia è preferibilmente cancro, più preferibilmente cancro esprimente PD-L1; il cancro è preferibilmente cancro al seno, cancro polmonare, cancro allo  
25 stomaco, cancro intestinale, cancro renale, melanoma, can-

A handwritten signature in black ink, located in the bottom right corner of the page. The signature is cursive and appears to read 'P. M. Roscetti'.

cro del polmone non a piccole cellule, e più preferibilmente cancro del polmone non a piccole cellule, melanoma e cancro renale.

#### **BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI**

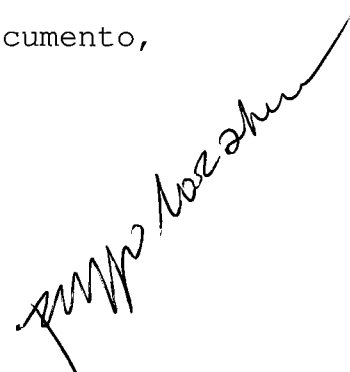
- 5 Figura 1: Saggio di proliferazione delle cellule mononucleari del sangue periferico umano. Il risultato mostra che l'Anticorpo in esame PD-1 mAb005 può stimolare efficacemente la proliferazione di cellule mononucleari del sangue periferico umano, con EC50 di 83 ng/ml.
- 10 Figura 2: Test di secrezione citochina IFN- $\gamma$  a cellule mononucleari di sangue periferico umano. Il risultato mostra che l'anticorpo PD-1 mAb005 può stimolare la proliferazione di PBMC, e stimolare efficacemente la secrezione di citochina IFN- $\gamma$  allo stesso tempo, con EC50 di 13 ng/ml.
- 15 Figura 3: effetto inibitorio dell'anticorpo PD-1 H005-1 sulla crescita delle cellule di glioma.
- Figura 4: diagramma mostrante la variazione del volume del tumore dopo il trattamento.
- Figura 5: diagramma mostrante la variazione di peso dei topi dopo il trattamento.
- 20

#### **DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELLA PRESENTE INVENZIONE**

##### 1. Definizioni

Al fine di comprendere meglio l'invenzione, alcuni termini tecnici e scientifici sono definiti in modo specifico di seguito. Salvo diversa definizione nel presente documento,

25



tutti i termini tecnici e scientifici utilizzati in questo contesto hanno lo stesso significato comunemente inteso da un esperto nella tecnica al quale appartiene questa invenzione.

- 5 Come utilizzato in questo contesto, il codice a una lettera e il codice a tre lettere per gli amminoacidi sono descritti in J. biol. chem, 243, (1968) p3558.

Come utilizzato in questo contesto, "Anticorpo" si riferisce all'immunoglobulina, una struttura a catena a quattro

- 10 peptidi collegati tra loro da legami disolfuro tra due catene pesanti identiche e due catene leggere identiche. Diverse regioni di catena pesante immunoglobulina pesante costante mostrano diverse composizioni di aminoacidi e ordini di rango, presentanti così diversi tipi di antigenicità. Di
- 15 conseguenza, le immunoglobuline possono essere suddivise in cinque categorie, o chiamati isotipi di immunoglobuline, cioè IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, le loro catene pesanti sono rispettivamente catena  $\mu$ , catena  $\delta$ , catena  $\gamma$ , catena  $\alpha$  e
- 20 catena  $\epsilon$ . Secondo la sua composizione aminoacidica della regione della cerniera e il numero e la posizione dei ponti disolfuro a catena, lo stesso tipo di Ig può essere diviso in diverse sottocategorie, ad esempio, IgG può essere diviso in IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. La catena leggera può essere suddivisa in catena  $\kappa$  o  $\lambda$  considerando le diverse regioni
- 25 ni costanti. Ognuno dei cinque Ig può avere una catena  $\kappa$  o

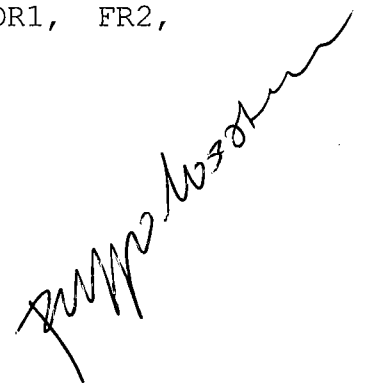
*James Roseman*

λ.

Nella presente invenzione, la regione variabile della catena leggera di anticorpo menzionata in questo contesto comprende inoltre una regione costante della catena leggera, 5 che comprende una catena umana o murina κ, λ o una variante della stessa.

Nella presente invenzione, la regione variabile della catena pesante di anticorpi menzionata in questo contesto comprende inoltre una regione costante di catena pesante, che 10 comprende IgG1, 2, 3, 4 umana o murina o una variante della stessa.

Vicino alla sequenza N-terminale delle catene di anticorpi pesanti e catene leggere, la sequenza di circa 110 aminoacidi varia notevolmente, nota come regione variabile (regione V); il resto della sequenza di aminoacidi vicino al C-terminale è relativamente stabile, nota come la regione costante (regione C). La regione variabile comprende tre 15 regioni ipervariabili (HVR) e quattro regioni struttura (FR) a sequenza relativamente conservata. Le tre regioni ipervariabili determinano la specificità dell'anticorpo, nota anche come regione determinante la complementarità (CDR). Ogni regione variabile a catena leggera (LCVR) e ogni regione variabile a catena pesante (HCVR) è composta da tre CDR e quattro FR, con ordine sequenziale dal terminale amminico al terminale carbossile: FR1, CDR1, FR2, 20

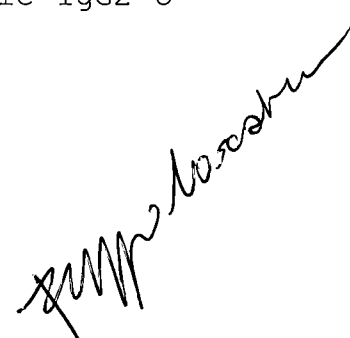


CDR2, FR3, CDR3, e FR4. I tre CDR a catena leggera si riferiscono a LCDR1, LCDR2 e LCDR3; i tre CDR a catena pesante si riferiscono a HCDR1, HCDR2 e HCDR3. I numeri e le posizioni dei residui di amminoacidi di CDR in LCVR e HCVR  
5 dell'anticorpo o del frammento legante l'antigene presente in questo contesto corrispondono a criteri di numerazione Kabat noti (LCDR1-3, HCDE2-3), o corrispondono a criteri di numerazione kabat e chothia (HCDR1).

Il termine "anticorpo murino" nella presente invenzione si  
10 riferisce all'anticorpo monoclonale anti-PD-1 umano, preparato secondo le conoscenze e le capacità nella tecnica. Durante la preparazione, ad un oggetto in esame è stato iniettato l'antigene PD-1, quindi è stato separato l'ibridoma esprimente l'anticorpo che possiede la sequenza desiderata o le caratteristiche funzionali. In una forma di  
15 realizzazione preferita della presente invenzione, l'anticorpo murino PD-1 o il suo frammento legante l'antigene comprende ulteriormente una regione costante a catena leggera di catena murina  $\kappa$ ,  $\lambda$  o una variante della stessa, o  
20 comprende ulteriormente una regione costante a catena pesante di IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 umano, o una variante della stessa.

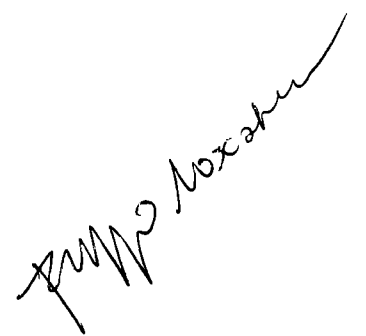
Il termine "anticorpo chimerico", è un anticorpo che si  
forma fondendo la regione variabile di un anticorpo murino  
25 con la regione costante di un anticorpo umano, l'anticorpo

chimerico può alleviare la risposta immunitaria indotta dall'anticorpo murino. Per stabilire un anticorpo chimerico, viene prima stabilito l'ibridoma secernente uno specifico anticorpo monoclonale murino, un gene a regione variabile viene clonato da cellule di ibridoma di topo, poi viene clonato a piacere un gene a regione costante di un anticorpo umano, il gene di topo a regione variabile viene legato con il gene umano a regione costante per formare un gene chimerico che possa essere inserito in un vettore umano, ed infine la molecola di anticorpo chimerico viene espressa nel sistema industriale eucariotico o procariotico. In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, la regione variabile della catena leggera dell'anticorpo chimerico PD-1 comprende inoltre la catena leggera FR della catena murina  $\kappa$ ,  $\lambda$  o una variante della stessa, e la sequenza della regione variabile della catena leggera è indicata in SEQ ID NO: 10. La regione variabile a catena pesante dell'anticorpo chimerico PD-1 comprende inoltre la catena di sollevamento FR di IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 murine o una loro variante, e la sequenza della regione variabile a catena pesante è indicata in SEQ ID NO: 9. La regione costante di un anticorpo umano è selezionata dalla regione costante a catena pesante di IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 umane o una variante di queste, comprende preferibilmente la regione costante a catena pesante delle IgG2 o



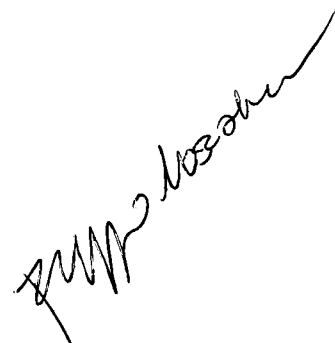
IgG4 umane, o quella delle IgG1 che non ha ADCC (citotossicità cellulo-mediata dipendente da anticorpi) dopo mutazione degli aminoacidi.

Il termine "anticorpo umanizzato", noto anche come anticorpo innestato con CDR, si riferisce ad un anticorpo generato dall'innesto di sequenze CDR murine in una struttura a regione variabile di un anticorpo umano, vale a dire, una sequenza di anticorpi umani di linea germinale di diverso tipo. L'anticorpo umanizzato supera la risposta anticorpale svantaggiosamente forte indotta dall'anticorpo chimerico che trasporta una grande quantità di componenti proteiche murine. Tali sequenze di struttura possono essere ottenute da una banca dati DNA pubblica che comprende sequenze di geni anticorpi di linea germinale o riferimenti pubblicati. Ad esempio, sequenze di DNA di linea germinale di geni umani a catena pesante e a catena leggera a regione variabile si trovano nel database di sequenza di linea germinale umana "VBase" Human (disponibile sul web [www.mrccpe.com.ac.uk/vbase](http://www.mrccpe.com.ac.uk/vbase)), così come si possono trovare in Kabat, EA, et al, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. In una forma di realizzazione preferita dell'invenzione, le sequenze murine CDR dell'anticorpo umanizzato PD-1 sono selezionate da SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8. Le strutture a regione variabile degli anticorpi umani sono state progettate e selezionate in modo ta-

A handwritten signature in black ink, located in the bottom right corner of the page. The signature is cursive and appears to read "P. M. Cox" or similar.

le che la sequenza FR della catena leggera della regione  
variabile della catena leggera degli anticorpi sia derivata  
dalla sequenza combinata delle catene leggere IGKV1-39 e  
JK4 della linea germinale umana: SEQ ID NO: 14, compreden-  
5 te FR1, FR2 e FR3 di IGKV 1-39 e FR4 di JK4; la sequenza FR  
della catena pesante della regione variabile a catena pe-  
sante di anticorpi è derivata dalla sequenza di combinazio-  
ne delle catene pesanti IgHV3-7 e JH6 della linea germinale  
umana: SEQ ID NO: 13, di cui FR1, FR2 e FR3 di IgHV3-7 e  
10 FR4 di JH6. Per evitare una diminuzione dell'attività du-  
rante la riduzione dell'immunogenicità, la regione variabi-  
le dell'anticorpo umano è soggetta ad una retromutazione  
minima per mantenere l'attività.

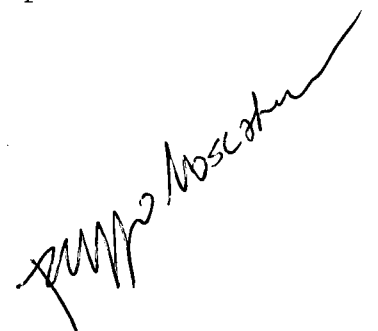
Come utilizzato in questo contesto, "frammento legante  
15 l'antigene" si riferisce ad un frammento di Fab, un fram-  
mento di Fab', un frammento di F(ab')<sub>2</sub> con attività legante  
l'antigene, così come un frammento di Fv frammento di sFv  
che si lega con PD-1 umano; comprendente una o più regioni  
CDR di anticorpi descritti nella presente invenzione sele-  
20 zionata dal gruppo composto da SEQ ID NO:3 a SEQ ID NO:8.  
Il frammento Fv è un frammento di anticorpo minimo compren-  
dente una regione variabile a catena pesante, una regione  
variabile a catena leggera e tutti i siti di legame  
dell'antigene senza una regione costante. In generale,  
25 l'anticorpo Fv comprende inoltre un polipeptide linker tra



i domini VH e VL, ed è in grado di formare una struttura richiesta per il legame con l'antigene. Inoltre, diversi linker possono essere usati per collegare le regioni variabili di due anticorpi per formare un polipeptide, chiamato anticorpo a catena singola o catena singola Fv (sFv). Come  
5 utilizzato in questo contesto, il termine "legante con PD-1", significa interagente con il PD-1 umano. Come utilizzato in questo contesto, il termine "determinante antigenico" della presente invenzione, si riferisce a siti tridimensionali discontinui sull'antigene, riconosciuto l'anticorpo o  
10 il frammento legante dell'antigene della presente invenzione.

Come utilizzato in questo contesto, il termine "ADCC", cioè citotossicità mediata da cellule dipendente da anticorpi,  
15 si riferisce a cellule esprimenti recettori Fc che uccidono direttamente le cellule bersaglio rivestite da un anticorpo attraverso il riconoscimento del segmento Fc dell'anticorpo. La funzione ADCC effettrice dell'anticorpo può essere ridotta o eliminata modificando il segmento Fc in IgG. La  
20 modifica si riferisce a mutazioni della regione costante della catena pesante di anticorpi, come mutazioni selezionate da N297A, L234A, L235A in IgG1; IgG2/4 chimera; F235E, o mutazioni L234A/E235A in IgG4.

Come utilizzato in questo contesto, la proteina di fusione  
25 descritta nella presente descrizione è un prodotto proteico



ottenuto dalla co-espressione di due geni attraverso la tecnologia del DNA ricombinante. Proteina di fusione Fc a dominio extracellulare ricombinante PD-1 ottenuta co-esprimendo un dominio extracellulare PD-1 e un frammento di anticorpo Fc umano attraverso la tecnologia del DNA ricombinante. Il dominio extracellulare PD-1 si riferisce alla porzione di PD-1 al di fuori della citomembrana, la cui sequenza è la regione di incisione di SEQ ID NO: 1 di seguito.

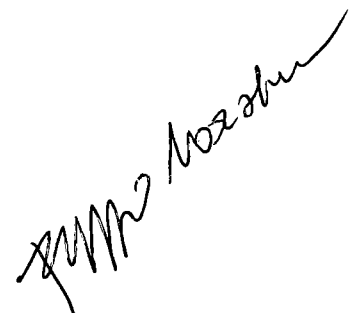
5

10 I metodi per produrre e purificare gli anticorpi e i frammenti leganti l'antigene sono ben noti nella tecnica e si possono trovare, per esempio, in Antibody Experimental Technology Guide of Cold Spring Harbor, Capitolo 5-8 e 15. Ad esempio, i topi possono essere immunizzati con PD-1 umano, o suoi frammenti, e gli anticorpi risultanti possono

15 quindi essere rinaturalizzati, purificati e sequenziati con metodi convenzionali ben noti nella tecnica. I frammenti leganti l'antigene possono essere preparati anche con metodi convenzionali. L'anticorpo o il frammento legante

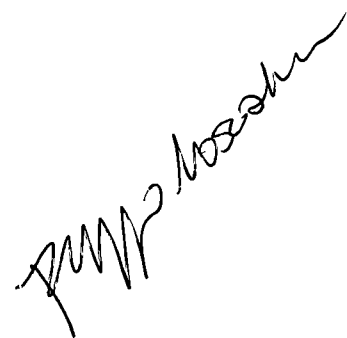
20 l'antigene della presente invenzione è stato progettato geneticamente per introdurre una o più regioni di struttura umane (FR) in un CDR di derivazione non umana. Le sequenze di linea germinale FR umane possono essere ottenute da ImmunoGeneTics (IMGT) tramite il loro sito web

25 <http://imgt.cines.fr>, o da The Immunoglobulin FactsBook,



2001ISBN012441351. In particolare, la linea germinale della catena leggera FR per l'uso nell'anticorpo o nel frammento legante l'antigene della presente invenzione includono A3 e O2. La linea germinale particolare di catena pesante FR per l'uso nell'anticorpo o il frammento legante l'antigene della presente invenzione includono VH3-21 e VH3-23.

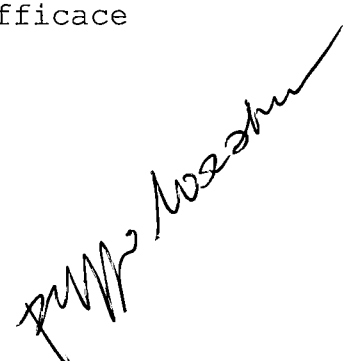
L'anticorpo ingegnerizzato o frammento legante l'antigene della presente invenzione può essere preparato e purificato con metodi convenzionali. Ad esempio, le sequenze cDNA codificanti una catena pesante (SEQ ID NO: 11) e una catena leggera (SEQ ID NO: 12) possono essere clonati e ricombinati in un vettore di espressione GS. Il vettore di espressione dell'immunoglobulina ricombinato può quindi trasfettare stabilmente le cellule CHO. Come metodo più raccomandato e ben noto nella tecnica, l'espressione di anticorpi da parte dei mammiferi si traduce in glicosilazione, tipicamente al terminale N altamente conservato nella regione FC. Si possono ottenere cloni stabili attraverso l'espressione di un anticorpo specificamente legato alla PCSK9 umana. I cloni positivi possono essere espansi in un terreno di coltura senza siero per la produzione di anticorpi nei bioreattori. Il terreno di coltura, in cui è stato secreto un anticorpo, può essere purificato con tecniche convenzionali. Ad esempio, il terreno può essere comodamente applicato ad una colonna Sepharose FF di Proteine A o G che è





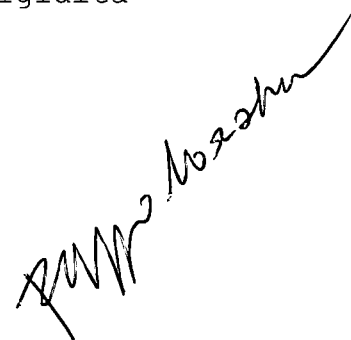
la, tessuto, organo o fluido biologico. "Somministrazione" e "trattamento" possono riferirsi, ad esempio, a metodi terapeutici, farmacocinetici, diagnostici, di ricerca e sperimentali. Il trattamento di una cellula comprende il contatto di un reagente con la cellula e il contatto di un reagente con un fluido, dove il fluido è in contatto con la cellula. Per "somministrazione" e "trattamento" si intendono anche i trattamenti in vitro ed ex vivo, ad esempio, di una cellula, mediante un composto reagente, diagnostico, legante o mediante un'altra cellula. Per "trattamento", così come si applica ad un essere umano, veterinario o ad un soggetto di ricerca, si riferisce a trattamenti terapeutici, misure profilattiche o preventive, ad applicazioni di ricerca e diagnostiche.

Per "trattamento" si intende la somministrazione di un agente terapeutico, quale una composizione comprendente uno qualsiasi dei composti leganti della presente invenzione, internamente o esternamente ad un paziente presentante uno o più sintomi di malattia di cui l'agente ha conosciuto l'attività terapeutica. Tipicamente, l'agente viene somministrato in una quantità efficace per alleviare uno o più sintomi di malattia nel paziente o nella popolazione trattata, sia inducendo la regressione o inibendo la progressione di tali sintomi a qualsiasi grado clinicamente misurabile. La quantità di un agente terapeutico che è efficace

A handwritten signature in black ink, located in the bottom right corner of the page. The signature is cursive and appears to read "P. M. Nozani".

per alleviare un particolare sintomo di malattia (detto anche "quantità terapeuticamente efficace") può variare a seconda di fattori quali lo stato di malattia, l'età e il peso del paziente, e la capacità del farmaco di ottenere una  
5 risposta desiderata nel paziente. Se un sintomo di malattia è stato alleviato può essere valutato con qualsiasi misura clinica tipicamente utilizzata dai medici o da altri operatori sanitari qualificati per valutare la gravità o lo stato di progressione di quel sintomo. Mentre una forma di  
10 realizzazione della presente invenzione (ad esempio, un anticorpo PD-1 o un suo frammento legante l'antigene o una composizione farmaceutica per il trattamento del cancro) può non essere efficace nell'alleviare i sintomi della malattia che interessano ogni paziente, dovrebbe alleviare  
15 il/i sintomo/i della malattia bersaglio di interesse in un numero statisticamente significativo di pazienti come determinato da qualsiasi test statistico noto nella tecnica, come lo Student's t-test, il test chi-quadrato, il test U secondo Mann e Whitney, il test Kruskal-Wallis (test H), il  
20 test Jonckheere-Terpstra e il test Wilcoxon.

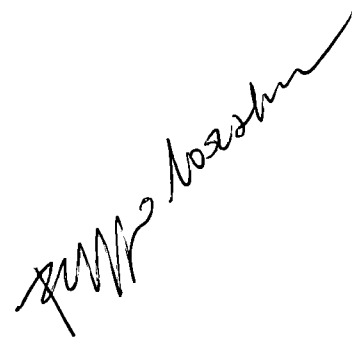
Per "modificazioni conservative" o "sostituzione o sostituzione conservativa" si intendono le sostituzioni di aminoacidi in una proteina con altri aminoacidi aventi caratteristiche simili (ad esempio carica, dimensioni della catena  
25 laterale, idrofobia/idrofilia, conformazione e rigidità



della colonna vertebrale, ecc.) tali che i cambiamenti possono essere fatti frequentemente senza alterare l'attività biologica della proteina. Coloro esperti in questa tecnica riconoscono che, in generale, le sostituzioni di singoli aminoacidi in regioni non-essenziali di un polipeptide non alterano sostanzialmente l'attività biologica (si veda, ad esempio, Watson et al. (1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)). Inoltre, le sostituzioni di aminoacidi strutturalmente o funzionalmente simili hanno meno probabilità di perturbare l'attività biologica.

"Costituito essenzialmente da", o dalla sua variazione così come utilizzato nelle specifiche e nelle rivendicazioni, indica l'inclusione di qualsiasi elemento o gruppo di elementi recitati e l'inclusione facoltativa di altri elementi di natura simile o diversa dagli elementi recitati, che non modificano materialmente le proprietà fondamentali o nuove del regime di dosaggio, del metodo o della composizione specificati. Come esempio non limitativo, un composto legante che consiste essenzialmente in una sequenza recitata di aminoacidi può includere anche uno o più aminoacidi che non influiscono materialmente sulle proprietà del composto legante.

"Quantità effettiva" comprende una quantità sufficiente a migliorare o prevenire un sintomo o un segno di una condi-



zione medica. Per quantità efficace si intende anche una quantità sufficiente a consentire o facilitare la diagnosi. Una quantità efficace per un particolare paziente o soggetto veterinario può variare a seconda di fattori quali la

5 condizione da trattare, la salute generale del paziente, la via e la dose di somministrazione e la gravità degli effetti collaterali. Una quantità efficace può essere la dose massima o il protocollo di dosaggio che evita effetti collaterali significativi o effetti tossici.

10 "Esogeno" si riferisce a sostanze prodotte al di fuori di un organismo, cellula o corpo umano, a seconda del contesto. Per "endogeno" si intendono le sostanze prodotte all'interno di una cellula, di un organismo o del corpo umano, a seconda del contesto.

15 "Omologia" si riferisce alla somiglianza di sequenza tra due sequenze di polinucleotidi o tra due polipeptidi. Quando una posizione in entrambe le due sequenze confrontate è occupata dalla stessa sottounità di base o di aminoacido monomero, ad esempio, se una posizione in ciascuna delle

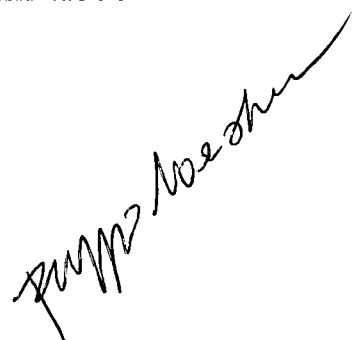
20 due molecole di DNA è occupata da adenina, allora le molecole sono omologhe in quella posizione. La percentuale di omologia tra due sequenze è una funzione del numero di posizioni corrispondenti o omologhe condivise dalle due sequenze divise per il numero di posizioni confrontate $\times 100$ .

25 Ad esempio, se 6 posizioni su 10 in due sequenze sono abbi-

nate o omologhe quando le sequenze sono allineate in modo ottimale, allora le due sequenze sono omologhe al 60%. Generalmente, il confronto si effettua quando due sequenze sono allineate per ottenere la massima omologia percentuale.

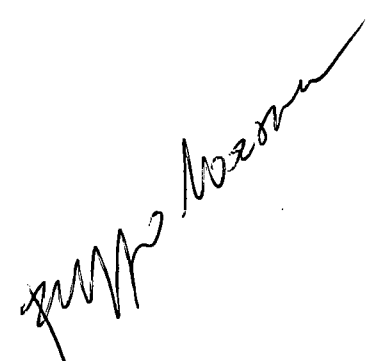
5 Come utilizzato in questo contesto, le espressioni "cellula", "linea cellulare" e "coltura cellulare" sono usate in modo intercambiabile e tutte queste denominazioni includono la progenie. Così, le parole "trasformatori" e "cellule  
10 trasformate" includono la cellula soggetto primario e le colture da essa derivate senza considerare il numero di trasferimenti. È inoltre inteso che tutta la progenie può non essere esattamente identica nel contenuto di DNA, a causa di mutazioni deliberate o involontarie. Sono incluse  
15 le progenie mutanti che hanno la stessa funzione o attività biologica della cellula originariamente trasformata. Nel caso in cui siano previste designazioni distinte, sarà chiaro dal contesto.

Come utilizzato in questo contesto, la "reazione a catena  
20 della polimerasi" o "PCR" si riferisce ad una procedura o tecnica in cui piccole quantità di una specifica frazione di acido nucleico, RNA e/o DNA, sono amplificate come descritto in, ad esempio, U.S. Pat. n. 4,683,195. Generalmente, devono essere disponibili informazioni sulla sequenza  
25 delle estremità della regione di interesse o oltre, in modo



da poter progettare primer oligonucleotidici; questi primer saranno identici o simili in sequenza ai corrispondenti filamenti del modello da amplificare. I nucleotidi terminali da 5' dei due primer possono essere identici alle estremità del materiale da amplificare. La PCR può essere utilizzata per amplificare specifiche sequenze di RNA, specifiche sequenze di DNA dal DNA genomico totale, e cDNA trascritto da RNA cellulare totale, sequenze di batteriofago o plasmidi, ecc. si veda in generale Mullis et al. (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich, ed., (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.). Come utilizzato in questo contesto, la PCR è considerata come un esempio, ma non l'unico, di un metodo di reazione della polimerasi dell'acido nucleico per amplificare un campione di acido nucleico, comprendente l'uso di un acido nucleico noto come primer e di una polimerasi dell'acido nucleico per amplificare o generare una frazione specifica dell'acido nucleico.

Per "facoltativo" o "facoltativamente" si intende che l'evento o la situazione che segue può verificarsi, ma non necessariamente, e la descrizione include i casi in cui l'evento o la circostanza si verifica o meno. Ad esempio, "opzionalmente comprende 1-3 regioni variabili della catena pesante di anticorpi" significa che la regione variabile della catena pesante di anticorpo con sequenza specifica può essere, ma non necessariamente essere presente.



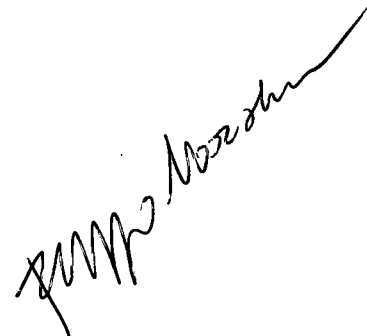
Per "composizione farmaceutica" si intende quella contenente una miscela di uno o più composti secondo la presente invenzione o un sale fisiologicamente/farmaceuticamente accettabile o un suo prodotto con altri componenti chimici, nonché componenti aggiuntivi quali vettori ed eccipienti fisiologicamente/farmaceuticamente accettabili. La composizione farmaceutica ha lo scopo di promuovere la somministrazione ad un organismo, facilitando l'assorbimento del principio attivo ed esercitando così un effetto biologico.

10 **DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELLA PRESENTE INVENZIONE**

Di seguito, la presente invenzione è ulteriormente descritta con riferimento agli esempi. Negli esempi della presente invenzione, dove non sono descritte condizioni specifiche, gli esperimenti sono generalmente condotti in condizioni convenzionali come descritto in Antibody Technology Laboratory Manual and Molecular Cloning Manual of Cold Spring Harbor, o nelle condizioni proposte dai produttori del materiale o del prodotto. Se la fonte dei reagenti non è indicata in modo specifico, i reagenti sono reagenti convenzionali disponibili in commercio.

**ESEMPIO 1 Preparazione dell'anticorpo**

Sono stati generati anticorpi monoclonali murini contro il PD-1 umano. Proteina di fusione Fc a dominio extracellulare ricombinante purificata PD-1 (PD-1 Fc) (SEQ ID NO: 1); oppure cellule CHO trasfettate con PD-1 (SEQ ID NO: 2) è stata



usata come antigene per immunizzare i topi Balb/C e SJL. L'antigene umano PD-1 è stato acquistato da ORIGENE, n. Cat SC117011, NCBI Reference Sequence: NM\_005018.1.

PD-1 Fc, proteina di fusione Fc a dominio extracellulare  
5 ricombinante PD-1 (SEQ ID NO: 1):

MDMRVPAQLLGLLLWFPGSRCPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATF  
TCSFSNTSESFVLNWyRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDF  
HMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPR  
PAGQFQTLVDKTHTCPPEPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV  
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
10 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS  
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK .

PD-1, PD-1, cellule trasfettanti antigene PD-1 (SEQ ID NO:  
2):

15 MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFT  
CSFSNTSESFVLNWyRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFH  
MSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPR  
AGQFQTLVGVVGGLLGSLVLLVWVLAIVCSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAV  
PVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGP  
RSAQPLRPEDGHCSWPL .

L'immunizzazione con la proteina di fusione Fc a dominio  
extracellulare PD-1 è divisa in alta dose (50ug) e bassa  
20 dose (10ug) dell'antigene purificato, l'immunizzazione con  
le cellule CHO trasfettate PD-1 usa cellule  $0,5-1 \times 10^7$ .  
L'immunizzazione è stata effettuata il giorno 0, 14 e 35  
rispettivamente con l'adiuvante di Complete Freund; il san-  
gue è stato prelevato nel sito retro-orbitale per monitora-  
25 re la risposta immunitaria. I topi con titolo di immunoglo-

bulina umana anti-PD-1 sono stati ottenuti mediante lo screening ELISA del plasma. Il giorno 56, i topi con il più alto titolo di immunoglobuline umane anti-PD-1 sono stati sottoposti a immunizzazione boost. 3 giorni dopo, i topi sono stati sacrificati e la milza è stata rimossa per la fusione. Le fusioni di ibridioma sono state sottoposte a screening ed è stato ottenuto un anticorpo monoclonale murino mAb005. La sequenza di regioni variabili a catena pesante e la sequenza di regioni variabili a catena leggera dell'anticorpo monoclonale murino mAb005 sono le seguenti:

mAb005 HCVR

EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYMMMSWVRQTPEKRLEWVATISG  
 GGANTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDALYYCARQLYFDYW  
 GQGTTLTVSS SEQID NO: 9

15 mAb005 LCVR

DIQMTQSPASQSASLGEGVTITCLASQTIGTWLWYQQKPGKSPQLLIYTATSLA  
 DGVPSRFGSGSGGTKFSFKISSLQAEDFVYCCQQVYSIPWTFGGGKLEIK  
 SEQID NO: 10

Le sequenze CDR sono come segue:

Nome	Sequenza	Numero
HCDR1	SYMMS	SEQID NO: 3
HCDR2	TISGGGANTYYPDSVKG	SEQID NO: 4
HCDR3	QLYFDY	SEQID NO: 5
LCDR1	LASQTIGTWLT	SEQID NO: 6

*Handwritten signature*

LCDR2	TATSLAD	SEQID NO: 7
LCDR3	QQVYSIPWT	SEQID NO: 8

### **Esempio 2: Screening degli anticorpi**

Saggio di legame ELISA in vitro con l'anticorpo PD-1:

L'anticorpo PD-1 blocca la via di segnalazione di PD-1 e il suo legante legandosi al dominio extracellulare PD-1. Il  
 5 saggio ELISA in vitro viene utilizzato per rilevare la proprietà legante dell'anticorpo PD-1. La proteina di fusione FC a dominio extracellulare PD-1 biotinilata (PD-1 FC) viene rivestita su piastre a 96 pozzetti legandosi all'avidina di neutralizzazione. L'intensità del segnale dopo l'aggiun-  
 10 ta dell'anticorpo viene utilizzata per determinare la proprietà legante dell'anticorpo e di PD-1.

L'avidina di neutralizzazione (che si lega alla biotina) è stata diluita a 1µl/ml con tampone PBS, pipettata in una piastra a 96 pozzetti con 100 µl/pozzetto e posizionata a  
 15 4°C per 16h-20h. La piastra a 96 pozzetti è stata lavata una volta con PBST (PH7.4 PBS, contenente 0,05% tween20) dopo la rimozione del tampone PBS, quindi la piastra è stata incubata e bloccata per 1 ora a temperatura ambiente con l'aggiunta di 120µl/pozzetto di latte PBST/1%. Dopo la ri-  
 20 mozione della soluzione bloccante, la piastra è stata lavata con tampone PBST, seguita dall'aggiunta di 1µg/ml di PD1-FC marcato con biotina, diluito con latte PBST/1% e incubato per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo la rimozione

della soluzione bloccante, la piastra è stata lavata con tampone PBST per 3 volte, seguita dall'aggiunta dell'anticorpo PD-1 del test, che è stato diluito ad una concentrazione adeguata con latte PBST/1% e incubato per 1,5 ore a temperatura ambiente. Dopo la rimozione del sistema di reazione, la piastra è stata lavata per 3 volte con tampone PBST, seguita dall'aggiunta di 100µl/pozzetto di anticorpo secondario antimurino marcato HRP (The Jackson Laboratory), diluito con latte PBST/1% e incubato per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo essere stata lavata con PBST per tre volte, la piastra è stata aggiunta con 100µl/pozzetto TMB, e incubata per 5-10 minuti a temperatura ambiente. Quindi la reazione è stata terminata con l'aggiunta di 100µl/pozzetto 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Il valore di assorbanza a 450 nm è stato letto sul lettore di micropiastre NOVOSTar; è stato calcolato il valore EC<sub>50</sub> di legame ELISA.

Anticorpo in esame	ELISA, EC <sub>50</sub> , nM	
	PD-1 umano	PD-1 cyno
mAb005	0,25	0,27

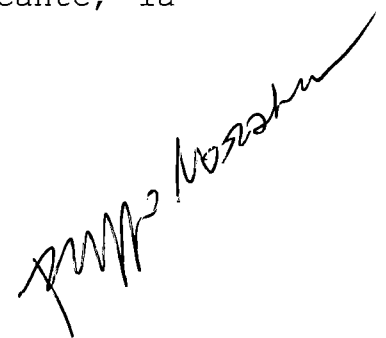
I risultati hanno dimostrato che l'anticorpo mAb005 ha mostrato un'eccellente attività legante per PD-1Fc umano (PD-1 umano) e PD-1Fc cynomolgus (PD-1 cyno).

Saggio di blocco in vitro del legame tra anticorpo PD-1 e ligando PD-1:

PD-L1 sulla superficie di una cellula tumorale mostra un effetto soppressivo sulla proliferazione delle cellule T legandosi a PD-1 sulla superficie di una cellula T. L'anticorpo PD-1 blocca il percorso di segnalazione PD-L1/PD-1  
5 legandosi a PD-1 in modo da stimolare la proliferazione delle cellule T. Saggio di blocco di legame PD-1/PD-L1 viene utilizzato per rilevare l'attività di blocco dell'anticorpo PD-1 sulla via di segnalazione.

In questo esperimento, una piastra a 96 pozzetti è stata  
10 rivestita con una proteina PD-1 con il dominio extracellulare fuso con FC (PD-1-FC), e incubata con l'anticorpo PD-1 del test; in seguito è stato aggiunto PD-L1 marcato con biotina per l'incubazione. Dopo il lavaggio della piastra, è stata rilevata la quantità di biotina marcata PD-L1; è  
15 stato calcolato il valore di blocco IC<sub>50</sub> dell'anticorpo per ligando legante PD-1.

PD-1-FC è stato diluito a 1µg/ml con PH 9,6 CB buffer (1,59g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 2,93g NaHCO<sub>3</sub> sono stati dissolti in 1L di acqua distillata), pipettato in una piastra a 96 pozzetti a  
20 100µl/pozzetto e posizionato per 16h-20h a 4°C. La piastra a 96 pozzetti è stata lavata una volta con PBST (PH7.4 PBS, contenente 0,05% tween20) dopo la rimozione del tampone PBS, quindi la piastra è stata incubata e bloccata per 1 ora a temperatura ambiente con 120µl/pozzetto di latte  
25 PBST/1%. Dopo la rimozione della soluzione bloccante, la

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Morata', is located in the bottom right corner of the page.

piastra è stata lavata una volta con tampone PBST, seguita dall'aggiunta di 90µl di anticorpo PD-1 di test, che è stato diluito ad una concentrazione adeguata con diluenti campione (PH7.4 PBS contenente 5%BSA, 0,05% Tween20), e incubato per 1 ora a 4°C. Quindi 10 X concentrazioni di PD-L1 marcato con biotina (Beijing Sino Biological Inc.) (10 µg/ml) sono state aggiunte alla piastra a 10 µl/pozzetto, oscillate e miscelate da un oscillatore e incubate a 37°C per 1 ora. Dopo la rimozione del sistema di reazione, la piastra è stata lavata per 6 volte con tampone PBST, seguita dall'aggiunta di 100µl/pozzetto di Streptavidina - Polimero Perossidasi che è stato diluito da PBST in un rapporto di 1:400, e incubato sotto oscillazione per 50min a temperatura ambiente. Dopo essere stata lavata con PBST per 6 volte, la piastra è stata aggiunta con 100µl/pozzetto TMB, e incubata per 5-10 minuti a temperatura ambiente. Quindi la reazione è stata terminata con l'aggiunta di 100µl/pozzetto 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Il valore di assorbanza a 450 nm è stato letto sul lettore di micropiastra NOVOSTar; è stato calcolato il valore di blocco IC<sub>50</sub> di PD-1 per ligando legante PD-L1.

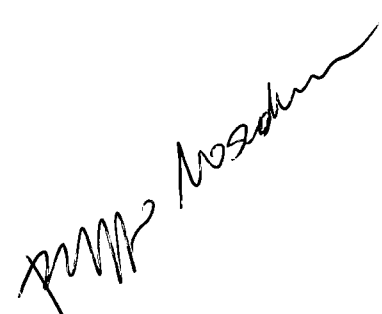
Anticorpo in esame	Saggio LBB
	IC50, nM
mAb005	1,13

*Pumpo*

Il risultato ha mostrato che l'anticorpo mAb005 era molto efficace per bloccare il legame di PD-L1 con PD-1.

**Esempio 3: Saggio di selettività legante dell'anticorpo PD-1 in vitro**

5 Per rilevare la specifica attività di legame dell'anticorpo PD-1 con altre proteine della famiglia PD-1, sono stati utilizzati CTLA4 e CD28 umani per i saggi di legame. Nel frattempo, il PD-1 dei topi è stato utilizzato anche per saggi di legame in modo da determinare la diversità degli  
10 anticorpi PD-1 per specie diverse da quella umana/scimmia. Proteine selettivamente leganti: PD-1 umano, ICOS umano, CTLA4 umano, CD28 umano e PD-1 topo, (Beijing Sino Biological Inc.), sono stati diluiti rispettivamente a 1µg/ml con tampone PBS, pipettati in una piastra a 96 pozzetti a  
15 100µl/pozzetto e sono stati posizionati per 16h-20h a 4 °C. La piastra a 96 pozzetti è stata lavata una volta con PBST (PH7.4 PBS, contenente 0,05% tween20) dopo la rimozione del tampone PBS, quindi la piastra è stata incubata e bloccata per 1 ora a temperatura ambiente con 120µl/pozzetto di  
20 latte PBST/1%. Dopo la rimozione della soluzione bloccante, la piastra è stata lavata con tampone PBST per 3 volte, seguita dall'aggiunta dell'anticorpo PD-1 e incubata per 1,5h a temperatura ambiente. Dopo la rimozione del sistema di reazione, la piastra è stata lavata per 3 volte con PBST,  
25 seguita dall'aggiunta di 100µl/pozzetto di anticorpo secon-



dario antimurino marcato HRP (The Jackson Laboratory), diluito con latte PBST/1% e incubato per 1 ora a temperatura ambiente. La piastra è stata lavata 3 volte con PBST, seguita dall'aggiunta di 100µl/pozzetto TMB, e incubata per 5-10 minuti a temperatura ambiente. Quindi la reazione è stata terminata con l'aggiunta di 100µl/pozzetto 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Il valore di assorbanza a 450 nm è stato letto sul lettore di micropiastre NOVOSTar.

Anticorpo in esame	PD1-FC umano	PD1-Fc topo	ICOS/Fc umano	CTLA4 umano	CD28 umano
mAb005	2,64	0,07	0,15	0,17	0,12

Il risultato ha dimostrato che l'anticorpo mAb005 non mostra alcuna specifica attività di legame con altre proteine della famiglia PD-1. Nel frattempo, mAb non ha una reattività incrociata di specie contro il PD-1 murino.

**Esempio 4: Saggio di legame cellulare in vitro dell'anticorpo PD-1**

FACS (fluorescence-activated cell sorter) è un metodo di prova per rilevare l'interazione di proteine e cellule. Il test è utilizzato per rilevare l'attività di legame dell'anticorpo PD-1 con il PD-1 nativo espresso sulla superficie cellulare. Le cellule utilizzate nel test sono cellule CHO ad alta espressione di PD-1 (si veda Esempio 1, cellule CHO trasfettate con PD-1 (SEQID NO: 2)).

Le cellule CHO ad alta espressione di PD-1 sono state centrifugate a 1000 rpm per 5 minuti, e il pellet è stato rac-

*Handwritten signature: PMP2020*

colto e sospeso con 10-15 ml di tampone di flusso preraffreddato per la conta cellulare. Le cellule sono state centrifugate a 1000 rpm in provette da centrifuga da 50 ml per 5 minuti e raccolte. Dopo la rimozione del supernatante, il pellet è stato risospeso con tampone di blocco preraffreddato con densità di  $0,5-1,0 \times 10^7$  cellule/ml. Dopo l'incubazione a 4 °C per 30 minuti, la risospensione è stata pipettata sulla piastra a 96 pozzetti a 100µl/pozzetto. La piastra a 96 pozzetti è stata centrifugata a 1500 rpm per 5 minuti, il supernatante è stato scartato. Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di anticorpo primario; le cellule sono state risospese e incubate al buio per 60 minuti a 4 °C. Dopo centrifugazione e scarto del supernatante, sono stati aggiunti 100 µl di anticorpo secondario marcato FITC (BD Biosciences) diluito a 1:400. Le cellule sono state risospese e incubate al buio per 60 minuti a 4 °C. Le cellule sono state lavate due volte con tampone di flusso, risospese e fissate con 1% di paraformaldeide per il saggio di citometria a flusso.

Anticorpo in esame	MFI			
	50nM	5nM	0,5nM	0,05nM
mAb005	468	319	71,2	14

I risultati mostrano che l'anticorpo mAb005 può legarsi al PD-1 sulla superficie cellulare.

**Esempio 5: Saggio di affinità legante e cinetica in vitro**

Il metodo Biacore è un dosaggio riconosciuto che rileva oggettivamente l'affinità interattiva e la cinetica delle proteine. Abbiamo analizzato l'affinità caratterizzata e la cinetica di legame dell'anticorpo PD-1 del test dell'attuale invenzione di Biacore (GE).

Secondo le istruzioni di un kit fornito da Biacore, l'anticorpo PD-1 di test della presente invenzione è stato covalentemente collegato al chip CM5 (GE) utilizzando un metodo standard di accoppiamento aminoacido. Poi una serie di concentrazioni di gradiente di PD-1 proteina His (Beijing Sino Biological Inc.), che sono state diluite nello stesso tampone, sono state caricate in ogni ciclo successivamente. Dopo di che, i campioni sono stati rigenerati con reagente rigenerato nel kit. La cinetica di legame antigene-anticorpo è stata monitorata per 3 minuti e la cinetica di dissociazione è stata monitorata per 10 minuti. I dati ottenuti sono stati analizzati dal software BIAevaluation di GE utilizzando il modello 1:1 (Langmuir). I valori di  $K_a$  (kon),  $k_d$  (koff) e  $KD$  determinati dal saggio sono stati riportati nella seguente tabella.

Anticorpo in esame	$k_a$ (1/MS)	$k_d$ (1/s)	$KD$ (M)
mAb005	1.057E+5	3.769E-4	3.566E-9

I risultati hanno mostrato che il valore  $K_d$  legante dell'anticorpo mAb005 a PD-1 ha raggiunto 3,57nM.

**Esempio 6 Test citologia in vitro**

Per rilevare l'attività cellulare dell'anticorpo mAb005 viene utilizzato un saggio di proliferazione di cellule mononucleate di sangue periferico umano fresco (PBMC) affette da anticorpo.

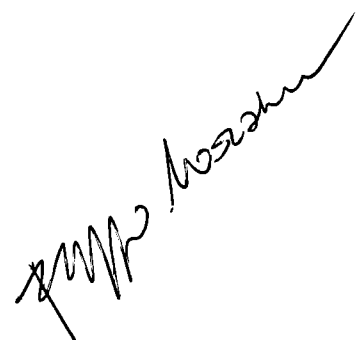
La densità di PBMC umano fresco è stata regolata a  $2 \times 10^6$ /ml, seminata in una piastra a 6 pozzetti a 2ml/pozzetto, e incubata per 6 ore a 37 °C, 5%CO<sub>2</sub>. Dopo che le cellule in sospensione sono state scartate, ogni pozzetto di cellule aderenti è stato mescolato con 2 ml di terreno RPMI1640 contenente 100ng/ml GM-CSF (fattore biologico di stimolazione delle colonie di granulociti) e 100 ng/ml IL-4, e un altro 1 ml di terreno RPMI1640 contenente 100ng/ml GM-CSF e 100 ng/ml IL-4 dopo incubazione per 2 giorni, poi le cellule sono state coltivate continuamente per 2 giorni, seguite dall'aggiunta di 100ng/ml TNF- $\alpha$  (fattore- $\alpha$  di necrosi tumorale) ogni pozzetto, e coltivate per altri 2 giorni per ottenere cellule dendritiche mature. Le cellule dendritiche e le cellule T allogeniche sono state rispettivamente centrifugate e risospese ad una concentrazione di  $1 \times 10^6$ /ml e  $1 \times 10^5$ /ml, e pipettate in una piastra a 96 pozzetti a 100 $\mu$ l/pozzetto, seguite dall'aggiunta di 20 $\mu$ l/pozzetto di anticorpo che è stato diluito a diversi gradienti di concentrazione con PBS, e le cellule sono state coltivate a 37 °C, incubatore di CO<sub>2</sub> al 5% per 5 giorni.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'PMP Boehm', is located in the bottom right corner of the page.

Successivamente, sono stati campionati 100  $\mu$ l di coltura cellulare per rilevare la proliferazione cellulare con il kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Il risultato è stato mostrato in Figura 1, indicante che l'Anticorpo in esame PD-1 mAb005 può stimolare efficacemente la proliferazione di cellule mononucleari del sangue periferico umano, con EC50 di 83 ng/ml. Il campione rimanente è stato rilevato per la secrezione di citochina IFN- $\gamma$ . Il risultato è stato mostrato in Figura 2, dimostrando che l'Anticorpo in esame PD-1 mAb005 potrebbe stimolare la proliferazione di PBMC, e stimolare efficacemente la secrezione di citochina IFN- $\gamma$  allo stesso tempo, con EC50 di 13 ng/ml.

#### **Esempio 7: Umanizzazione degli anticorpi murini**

Con riferimento alle sequenze della regione variabile della catena leggera (mAb005 LCVR, SEQ ID NO: 10) e la regione variabile della catena pesante (mAb005 HCVR, SEQ ID NO: 9) dell'anticorpo mAb005, sono stati selezionati i modelli umanizzati che meglio si abbinano al loro non-CDR nel database Germline. Il modello di catena pesante di anticorpi è IgHV3-7/JH6, selezionando per FR1, FR2, FR3 della catena leggera di linea germinale umana IGKV1-39 e FR4 di JK4, con sequenza di SEQ ID NO: 13; il modello della catena leggera è IGKV1-39/JK4, selezionando per FR1, FR2, FR3 della catena leggera germinale umana IGKV1-39, e FR4 di JK4, con sequenza di SEQ ID NO: 14.



PRL040ESM

Modello di catena pesante per la linea germinale umana (SEQ

ID NO: 13):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQ  
DGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGQGT  
TVSS;

5 Modello di catena leggera della linea germinale umana (SEQ

ID NO: 14):

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCFGGGKVEIK .

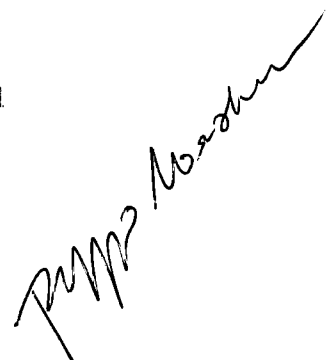
10 Il CDR dell'anticorpo murino è stato innestato al modello  
di umanizzazione selezionato, sostituendo il CDR del model-  
lo umano, e poi ricombinato con la regione costante IgG4  
per ottenere un anticorpo umanizzato H005-1. Successivamen-  
te, sulla base della struttura tridimensionale dell'anti-  
corpo murino, i residui incorporati, i residui che intera-  
15 giscono direttamente con il CDR e i residui che influenzano  
significativamente la conformazione di VL e VH sono stati  
rimossi per ottenere anticorpi umanizzati H005-2, H005-3 e  
H005-4, le sequenze sono le seguenti.

Espressione anticorpo

20 H005-1 HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMMSWVRQAPGKGLEWVATISG  
GGANTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLYYFDY  
WGQGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKR  
VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPE  
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
25 SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL  
HNHYTQKSLSLGK

SEQID NO: 11



H005-1 LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCLASQTIGTWLTWYQQKPGKAPKLLIYTATSLA  
 DGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDEATYYCQQVYSIPWTFGGGTKVEIKRTVA  
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
 QDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

SEQID NO: 12

La sequenza HC dell'anticorpo umanizzato H005-1 con CDR murino innestato è (SEQID NO: 11), la sequenza LC dell'anticorpo umanizzato è (SEQ ID NO: 12). I siti che possono influenzare l'attività degli anticorpi sono stati sottoposti a mutazioni puntiformi, le sequenze sono le seguenti:

10

	HC	LC
H005-1	SEQID NO: 11	SEQID NO: 12
H005-2	SEQID NO: 11, G44R	SEQID NO: 12
H005-3	SEQID NO: 11	SEQID NO: 12, A43S
H005-4	SEQID NO: 11, G44R	SEQID NO: 12, A43S

15

I cDNA sono stati sintetizzati secondo le sequenze amminoacidiche della catena leggera e della catena pesante di ciascun anticorpo umanizzato (SEQ NO 11, SEQ NO 12 e relative varianti). Dopo che i cDNA sono stati digeriti con XhoI e BamHI, i frammenti di cDNA ottenuti sono stati inseriti in vettori di espressione pcDNA3.1 (Life Technologies n. Cat. V790-20) nei siti di restrizione BamHI/XhoI. I vettori di espressione e un reagente di trasfezione PEI (Polysciences,

Inc. Cat. n. 23966) sono stati utilizzati per trasfettare le cellule HEK293 (Life Technologies Cat. n. 11625019) a 1:2, e le cellule trasfettate sono state incubate in un incubatore di CO<sub>2</sub> per 4-5 giorni. Gli anticorpi espressi sono stati recuperati per centrifugazione e purificati secondo un metodo convenzionale per ottenere gli anticorpi umanizzati della presente invenzione.

**Esempio 8: Dati sull'attività degli anticorpi umanizzati**

Gli anticorpi umanizzati sono stati sottoposti in vitro al saggio di legame ELISA (il metodo è lo stesso dell'Esempio 2), al saggio di blocco dei ligandi leganti (il metodo è lo stesso dell'Esempio 2) e all'esperimento di affinità cinetica (il metodo è lo stesso dell'Esempio 5) in vitro. I risultati sono mostrati nella seguente tabella:

Anticorpo in esame	ELISA, EC50, nM	Saggio LBB, IC50, nM	KD(M)
H005-1	0,11	1,27	2,79E-09
H005-2	0,14	1,27	2,98E-09
H005-3	0,15	1,33	2,45E-09
H005-4	0,14	1,36	3,89E-09

Il risultato ha mostrato che gli anticorpi umanizzati H005-1, H005-2, H005-3 e H005-4 hanno mantenuto l'attività legante del PD-1, con affinità cinetica KD di 2,79, 2,98, 2,45 e 3,89 nM rispettivamente. Allo stesso tempo, tutti gli anticorpi umanizzati hanno mostrato un'efficace attivi-

tà di blocco contro la via PD-L1/PD-1.

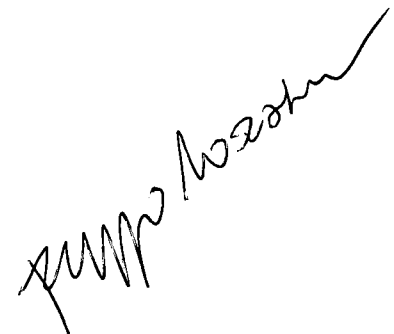
**Esempio 9: Inibizione della crescita delle cellule tumorali da parte dell'anticorpo PD-1**

**1. Materiali sperimentali:**

- 5 Cellule U87MG (cellule di glioma): acquistate presso Chinese Academy of Sciences Cell Bank, Cat. TCHul38;  
Le PBMC (cellule mononucleate del sangue periferico) acquistate presso Shanghai Blood Center;  
CD3: acquistato presso Miltenyi Biotec Cat n. 130-093-387;  
10 CD28: acquistato presso Miltenyi Biotec Cat n. 130-093-375;  
Cell Counting Kit-8: disponibile presso DOJINDO LABORATORIES, numero di catalogo CK04;  
mIgG (controllo negativo): acquistato da SANTA CRUZ numero di catalogo. sc-2025; utilizzando dose di 1660ng/ml.

15 **2. Metodi sperimentali:**

- 1) Le cellule U87MG sono state coltivate in terreno EMEM contenente 10% FBS e 1% P/S, incubate in una piastra a 96 pozzetti,  $1 \times 10^4$  cellule per pozzetto.
- 2) L'anticorpo H005-1 è stato diluito a diversi gradienti di concentrazione (mostrato in ascissa di Fig. 3) con PBS, aggiunto alla piastra a 96 pozzetti a 10 $\mu$ l/pozzetto, e incubato a 37°C, incubatore di CO<sub>2</sub> al 5% per 4 ore.
- 20 3) Dopo l'adesione cellulare, 80 $\mu$ l di sospensione cellulare PBMC è stata aggiunta ad ogni pozzetto con una densità cellulare di  $2 \times 10^4$  cellule/pozzetto, e 10 $\mu$ l di anticorpi CD3 e
- 25



CD28 sono stati aggiunti in ogni pozzetto, le concentrazioni finali di anticorpi CD3 e CD28 erano entrambe 500ng/ml.

4) Dopo 72 ore di incubazione in un incubatore a 37°C, 5% di CO<sub>2</sub>, a ciascun pozzo sono stati aggiunti 10µl di CCK8  
5 per lo sviluppo. 2 ore dopo, l'OD450 è stato determinato.

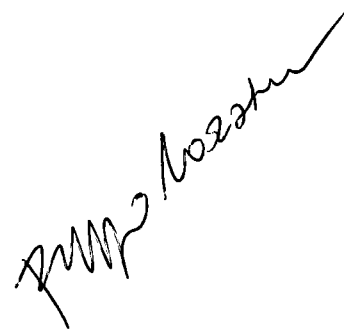
### 3. Risultato:

Il risultato è stato mostrato in figura 3, rispetto a mIgG (controllo negativo), diverse concentrazioni di anticorpo PD-1 (H005-1) hanno avuto un significativo effetto inibitorio sulla crescita cellulare di U87MG, e il tasso di inibizione alla massima concentrazione è stato di circa il 30%.

#### **Esempio 10: Attività di H005-1 sulla proliferazione di PBMC stimolata da tubercolina**

È stata rilevata l'attività dell'anticorpo umanizzato H005-1 sulla proliferazione in vitro di PBMC stimolata da tubercolina.  
15

A 15 ml di PBMC freschi, circa  $3 \times 10^7$  cellule, sono state aggiunte 20µl di tubercolina (Shanghai BiYou Biotechnology, cat#97-8800) e la miscela è stata incubata per 5 giorni  
20 nell'incubatore a 37 °C, 5% di CO<sub>2</sub>. Il giorno 6, le cellule coltivate sono state centrifugate e risospese in terreno fresco con una densità regolata a  $5 \times 10^5$  cellule/ml. 190 µl di cellule risospese sono state piantate in ogni pozzetto di una piastra a 96 pozzetti. L'anticorpo umanizzato H005-1  
25 è stato aggiunto ai pozzetti corrispondenti della piastra a



96 pozzetti a 10µl/pozzetto. Il gruppo di controllo e il gruppo grezzo sono stati aggiunti con 10 µl di PBS. La piastra di coltura cellulare è stata incubata in un incubatore a 37 °C, 5% di CO<sub>2</sub>, e 72 ore dopo sono state determinate le secrezioni PBMC Proliferation (Promega, cat # G7571) e IFN-γ (Neo Bioscience, cat # EHC102g). I risultati sono i seguenti:

**Effetto di attivazione del campione in esame sulla proliferazione di PBMC stimolata dalla tubercolina e secrezione**

**10 IFN-γ**

Campione	Proliferazione delle cellule T EC50 (ng/ml)	IFN-λ EC50 (ng/ml)
H005-1	15,95±17,15	56,87±48,53
Nota: n=4		

I risultati degli esperimenti hanno mostrato che l'anticorpo umanizzato H005-1 attiva in modo eccellente la proliferazione di PBMC stimolata da tubercolina esogena e la secrezione di IFN-γ.

**15 Esempio 11: Inibizione del tumore inoculato sottocutaneamente U-87MG da H005-1**

100ul di cellule U87 ( $5 \times 10^6$  cellule) è stato inoculato per via sottocutanea nelle costole destra dei topi SCID-Beige. Quando il tumore è cresciuto a 80-100mm<sup>3</sup> dopo 7-10 giorni, i topi SCID-Beige, eliminando quelli con peso corporeo o tumore troppo grande o troppo piccolo, sono stati divisi

*Fumo Morata*

casualmente in un gruppo H005-1 10 mg/kg e un gruppo di IgG umano 10 mg/kg secondo il volume del tumore, ogni gruppo di sette topi (D0). Due tipi di PBMC stimolati dall'anticorpo CD3 per 3 giorni sono stati miscelati in un rapporto di 1: 5 1, e iniettati nei tessuti tumorali a  $5 \times 10^5$  cellule/60 ul, nel frattempo, l'anticorpo in esame è stato iniettato per via sottocutanea, una volta ogni 7 giorni per un totale di 3 dosi. I topi sono stati misurati per il volume del tumore e pesati due volte alla settimana. I dati sono stati regi- 10 strati. Il volume del tumore (V) è stato calcolato come:  $V = 1/2 \times a \times b^2$ , in cui a e b rappresentano rispettivamente la lunghezza e la larghezza.

Il risultato è stato mostrato in Figura 4: cambiamento di volume tumorale dopo il trattamento, e Figura 5: cambiamen- 15 to di peso dei topi dopo il trattamento, indicante che l'anticorpo H005-1 ha inibito in modo eccellente la crescita del tumore U87MG, e non ha avuto alcun effetto sul peso corporeo dei topi.

*Gruppo Masetti*

RIVENDICAZIONI

1. Un anticorpo PD-1 o un suo frammento legante l'antigene, comprendente:  
una catena leggera a regione variabile comprendente un  
5 LCDR1, un LCDR2 e un LCDR3 come mostrato in SEQ ID NO: 6,  
SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8, rispettivamente; e  
una catena pesante a regione variabile comprendente un  
HCDR1, un HCDR2 e un HCDR3 come mostrato in SEQ ID NO: 3,  
SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 5, rispettivamente
- 10 2. L'anticorpo PD-1 o il suo frammento legante l'antigene secondo la rivendicazione 1, in cui l'anticorpo o il suo frammento legante l'antigene è un anticorpo chimerico.
3. L'anticorpo PD-1 o il suo frammento legante l'antigene secondo la rivendicazione 2, in cui la regione variabile a  
15 catena leggera comprende la sequenza di aminoacidi di cui a SEQ ID NO:10 e la regione variabile a catena pesante comprende la sequenza di aminoacidi di cui a SEQ ID NO:9.
4. L'anticorpo PD-1 o il suo frammento legante l'antigene secondo la rivendicazione 1, in cui l'anticorpo o il fram-  
20 mento legante l'antigene è un anticorpo umanizzato.
5. L'anticorpo PD-1 o il suo frammento legante l'antigene secondo la rivendicazione 4, in cui:  
la regione variabile della catena pesante comprende le regioni di struttura (FR) della catena pesante corrispondenti  
25 a FR1, FR2 e FR3 di IgHV3-7 e FR4 di JH6, ciascuna delle

quali deriva dalla sequenza di combinazione di catene pesanti di linee germinali umana raffigurate in SEQ ID NO:13; e

la regione variabile della catena leggera comprende le regioni FR della catena leggera corrispondenti a FR1, FR2 e FR3 di IGKV 1-39 e FR4 di JK4, ciascuna delle quali deriva dalla sequenza di combinazione di catene leggere di linea germinale umana raffigurata in SEQ ID NO:14.

6. L'anticorpo PD-1 o il suo frammento legante l'antigene secondo la rivendicazione 4, comprendente:

una catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi riportata in SEQ ID NO:11; e

una catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi riportata in SEQ ID NO:12.

7. Una molecola di DNA codificante l'anticorpo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6.

8. Un vettore di espressione comprendente la molecola di DNA secondo la rivendicazione 7.

9. Una cellula ospite trasformata con il vettore di espressione secondo la rivendicazione 8.

10. La cellula ospite secondo la rivendicazione 9, in cui la cellula ospite è batteri.

11. La cellula ospite secondo la rivendicazione 9, in cui la cellula ospite è lievito.

12. Una composizione farmaceutica comprendente l'anticorpo

A handwritten signature in black ink, located in the bottom right corner of the page. The signature is cursive and appears to read 'Piero Bazzani'.

PD-1 o il frammento legante l'antigene secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6 e un eccipiente, diluente o vettore accettabile dal punto di vista farmaceutico.

5 13. L'anticorpo PD-1 o il frammento legante l'antigene secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6, o la composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 12 per l'uso nella cura del cancro.

10 14. L'anticorpo PD-1 o il frammento legante l'antigene secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6, o la composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 12 per l'uso nel trattamento del cancro al seno, cancro ai polmoni, cancro allo stomaco, cancro intestinale, cancro renale, melanoma o cancro del polmone non a piccole cellule.

*Handwritten signature*

## SEQUENCE LISTING

<110> SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD., JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.

<120> Anticorpo PD-1, frammento legante l'antigene dello stesso e applicazione medica dello stesso

<130> SHP17186PCTEP

<140> EP 14 868 918.5

<141> 2014-11-14

<150> PCT/CN2014/091090

<151> 2014-11-14

<150> CN 201310681942.6

<151> 2013-12-12

<160> 14

<170> BrevettoIn Versione 3.3

<210> 1

<211> 399

<212> PRT

<213> Sequenza Artificiale

<220>

<223> proteina di fusione Fc a dominio extracellulare ricombinante PD-1

<400> 1

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
1 5 10 15

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

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

Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser  
50 55 60

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

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

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

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

*Handwritten signature: PMP Nozaki*

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 180 185 190

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 195 200 205

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 210 215 220

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 225 230 235 240

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 245 250 255

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 260 265 270

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 275 280 285

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 290 295 300

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 305 310 315 320

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 325 330 335

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 340 345 350

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 355 360 365

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

*Handwritten signature*





<213> Mus musculus LCDR1

<400> 6

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Thr  
1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus LCDR2

<400> 7

Thr Ala Thr Ser Leu Ala Asp  
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus LCDR3

<400> 8

Gln Gln Val Tyr Ser Ile Pro Trp Thr  
1 5

<210> 9

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus vVH

<400> 9

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Met Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

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

*Handwritten signature*

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 10  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Mus musculus VL  
  
<400> 10

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

Glu Gly Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Thr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Tyr Ser Ile Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 11  
<211> 443  
<212> PRT  
<213> Sequenza Artificiale

<220>  
<223> sequenza a catena pesante di anticorpo umanizzato H005-1

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

*Handwritten signature*

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

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

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

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

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

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

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

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro  
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
225 230 235 240

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn  
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
290 295 300

*Handwritten signature*

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

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

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

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly  
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
435 440

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> Sequenza Artificiale

<220>

<223> sequenza a catena pesante di anticorpo umanizzato H005-1

<400> 12

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Thr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

*F. M. Marzulli*

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Tyr Ser Ile Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 13

<211> 109

<212> PRT

<213> Sequenza Artificiale

<220>

<223> Sequenza della regione della struttura a catena pesante di anticorpo umanizzato

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

*F. M. Mazzanti*

50

55

60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 100 105

<210> 14

<211> 98

<212> PRT

<213> Sequenza Artificiale

<220>

<223> Sequenza della regione della struttura a catena pesante di anticorpo umanizzato

<400> 14

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu  
 85 90 95

Ile Lys

*Handwritten signature: Giuseppe Moscatelli*

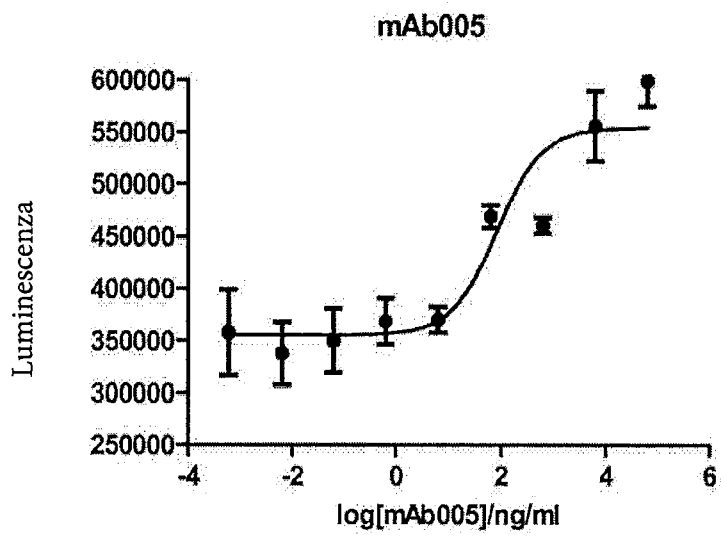


Figura 1

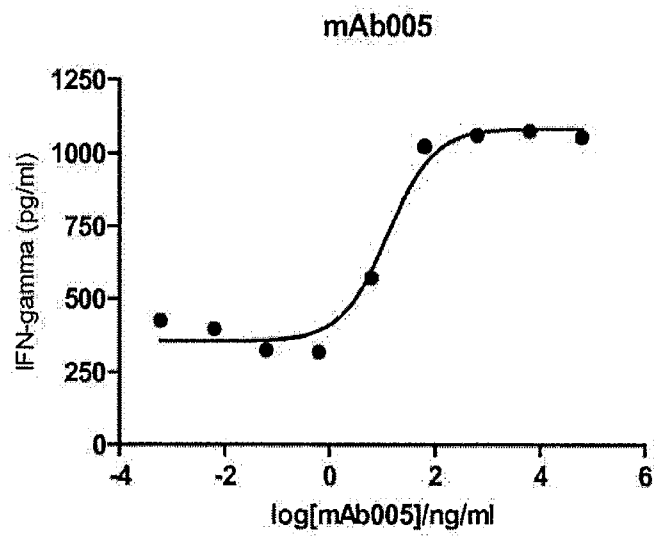


Figura 2

*Federico Rossetti*

### Saggio di proliferazione U87MG

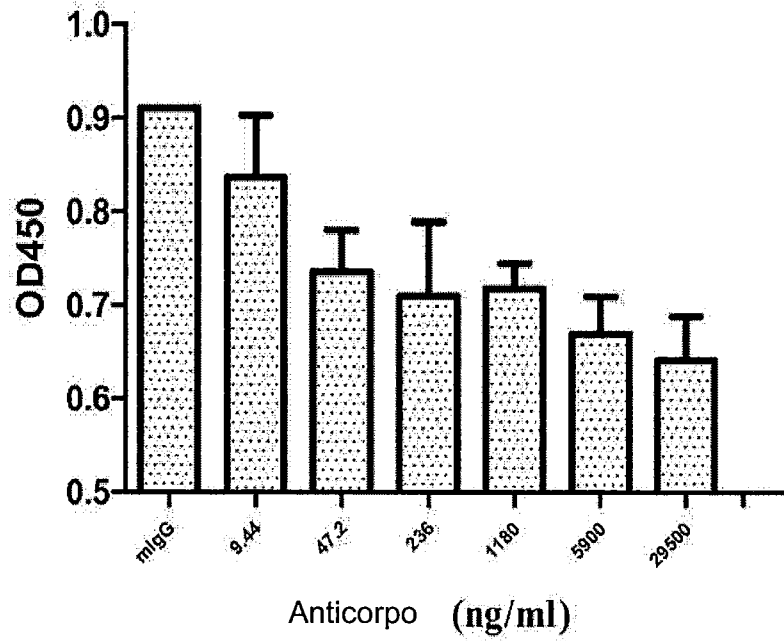


Figura 3

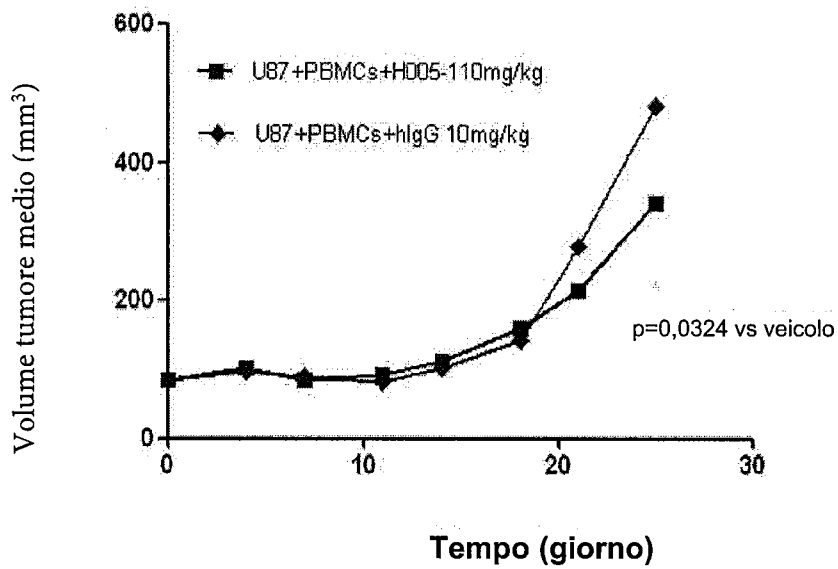


Figura 4

*Handwritten signature*

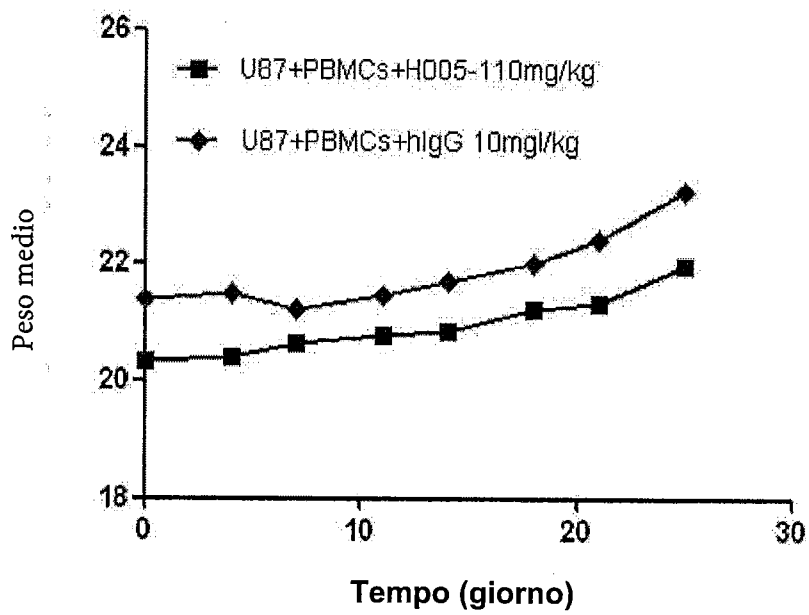


Figura 5

*Handwritten signature*