

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201691482** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2016.11.30

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.01.23

(54) **ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К PD-1**

(31) **61/930,576; 62/014,181**

(32) **2014.01.23; 2014.06.19**

(33) **US**

(86) **PCT/US2015/012589**

(87) **WO 2015/112800 2015.07.30**

(71) Заявитель:

**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Парадопулос Николас Дж., Мерфи
Эндрю Дж., Терстон Гэвин, Иоффе
Элла, Бурова Елена (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение предоставляет антитела, которые связываются с Т-клеточным соингибиторным белком программируемой смерти-1 (PD-1), и способы применения. В различных вариантах осуществления изобретения антитела являются полностью человеческими антителами, которые связываются с PD-1. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предоставляет мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первую специфичность связывания, которая связывается с PD-1, и вторую специфичность связывания, которая связывается с антигеном аутоиммунной ткани, еще одним Т-клеточным соингибитором, Fc рецептором или Т-клеточным рецептором. В нескольких вариантах осуществления антитела изобретения являются применимыми для ингибирования или нейтрализации активности PD-1, таким образом, предоставляя средство лечения заболевания или расстройства, такого как злокачественное новообразование или хроническая вирусная инфекция. В других вариантах осуществления антитела являются применимыми для усиления или стимуляции активности PD-1, таким образом, предоставляя средство лечения, например, аутоиммунного заболевания или расстройства.

A1

201691482

201691482

A1

ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К PD-1

Описание

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[001] Настоящее изобретение относится к человеческим антителам и антигенсвязывающим фрагментам человеческих антител, которые специфично связываются с иммуномодулирующим рецептором программируемой смерти-1 (PD-1), и терапевтическим и диагностическим способам применения этих антител.

СОСТОЯНИЕ РОДСТВЕННОЙ ОБЛАСТИ ТЕХНИКИ

[002] Программируемая смерть-1 (PD-1) (также называемый CD279) представляет собой белковый рецептор из 288 аминокислот, экспрессируемый на активированных Т-клетках и В-клетках, естественных клетках-киллерах и моноцитах. PD-1 является членом семейства CD28/CTLA-4 (антигенов цитотоксических Т-лимфоцитов 4)/ICOS (индуцируемых костимуляторов) Т-клеточных соингибирующих рецепторов (Chen et al 2013, Nat. Rev. Immunol. 13: 227-242). Первичной функцией PD-1 является ослабление иммунного ответа (Riley 2009, Immunol. Rev. 229: 114-125). PD-1 имеет два лиганда, PD-лиганд1 (PD-L1) и PD-L2. PD-L1 (CD274, B7H1) интенсивно экспрессируется как в лимфоидных, так и в нелимфоидных тканях, таких как CD4 и CD8 Т-клетки, клетки линий макрофагов, периферические ткани, а также в опухолевых клетках, клетках, инфицированных вирусами и клетках аутоиммунных тканей. PD-L2 (CD273, B7-DC) имеет более ограниченную экспрессию, чем PD-L1, будучи экспрессируемым в активированных дендритных клетках и макрофагах (Dong et al 1999, Nature Med.). PD-L1 экспрессируется при большинстве злокачественных новообразований человека, включающих меланому, глиому, немелкоклеточный рак легких, плоскоклеточный рак области головы и шеи, лейкемию, рак поджелудочной железы, почечно-клеточную карциному и гепатоклеточную карциному, и может индуцироваться почти при всех типах злокачественных новообразований (Zou and Chen 2008, Nat. Rev. Immunol. 8: 467-77). Связывание PD-1 с его лигандами в результате приводит к пониженной пролиферации Т-клеток и секреции цитокинов, нарушая гуморальные и клеточные

иммунные ответы при заболеваниях, таких как злокачественное новообразование, вирусная инфекция и аутоиммунное заболевание. Блокаду связывания PD-1 с обратимой иммуносупрессией исследовали при иммунотерапии аутоиммунных, вирусных и опухолевых заболеваний (Ribas 2012, NEJM 366: 2517-2519; Watanabe et al 2012, Clin. Dev. Immunol. Volume 2012, Article ID: 269756; Wang et al 2013, J. Viral Hep. 20: 27-39).

[003] Т-клеточные костимулирующие и со-ингибирующие молекулы (обобщенно называемые косигнальными молекулами) играют решающую роль в регуляции активации Т-клеток, внутригрупповой дифференциации, эффекторной функции и выживаемости (Chen et al 2013, Nature Rev. Immunol. 13: 227-242). После распознавания когнатных пептид-МНС комплексов на антигенпрезентирующих клетках Т-клеточными рецепторами, косигнальные рецепторы солокализуются с Т-клеточными рецепторами в иммунном синапсе, где они синергитичеки взаимодействуют с сигнальным путем TCR, чтобы инициировать или ингибировать активацию и функцию Т-клеток (Flies et al 2011, Yale J. Biol. Med. 84: 409-421). Окончательный иммунный ответ регулируется балансом между костимулирующими и со-ингибирующими сигналами ("иммунными контрольными точками") (Pardoll 2012, Nature 12: 252-264). PD-1 функционирует в качестве одной такой "иммунной контрольной точки" при опосредовании толерантности периферических Т-клеток и при предотвращении аутоиммунности. PD-1 связывается с PD-L1 или PD-L2 и ингибирует активацию Т-клеток. Способность PD1 ингибировать активацию Т-клеток используется хроническими вирусными инфекциями и опухолями, чтобы уклониться от иммунного ответа. При хронических вирусных инфекциях, PD-1 интенсивно экспрессируется в вирус-специфичных Т-клетках, и эти Т-клетки становятся "истощенными" с потерей эффекторных функций и пролиферативной способности (Freeman 2008, PNAS 105: 10275-10276). PD-L1 экспрессируется в разнообразных опухолях, и исследования на животных моделях показали, что PD-L1 в опухолях ингибирует активацию Т-клеток и лизис опухолевых клеток и может приводить к увеличенной смерти опухолеспецифичных Т-клеток. Система PD-1:PD-L1 также играет важную роль в индуцировании Т-

регуляторного (Treg) развития клеток и в поддержании Treg функции (Francisco et al 2010, Immunol. Rev. 236: 219-242).

[004] Поскольку PD-1 играет важную роль при аутоиммунитете, иммунитете против опухолей и иммунитете против инфекций, он представляет собой идеальную мишень для иммунотерапии. Блокирование PD-1 антагонистами, включающими моноклональные антитела, исследовали при терапиях злокачественных новообразований и хронических вирусных инфекциях (Sheridan 2012, Nature Биотехнологии 30: 729-730).

[005] Моноклональные антитела к PD-1 известны в данной области и были описаны, например, в патентных публикациях США №№ 8008449, 8168757, 20110008369, 20130017199, 20130022595, и в WO2006121168, WO20091154335, WO2012145493, WO2013014668, WO2009101611, EP2262837 и EP2504028.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[006] Настоящее изобретение предоставляет антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с PD-1. Антитела настоящего изобретения являются применимыми, среди прочего, для целенаправленного действия на Т-клетки, экспрессирующие PD-1, и для модуляции активности PD-1. В некоторых вариантах осуществления, антитела изобретения являются применимыми для ингибирования или нейтрализации активности PD-1 и/или для стимуляции активации Т-клеток, например, при обстоятельствах, где опосредованное Т-клетками уничтожение является благоприятным или желательным. В альтернативных вариантах осуществления, антитела увеличивают связывание и/или активность PD-1, и могут применяться для ингибирования активации Т-клеток. Антитела против PD-1 изобретения, или их антигенсвязывающие части, могут быть включены в качестве части мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, например, чтобы модулировать иммунный ответ и/или нацеливать антитела на специфический тип клеток, такой как опухолевая клетка, клетка аутоиммунной ткани или клетка, инфицированная вирусом. Антитела являются применимыми при лечении заболевания или расстройства, такого как злокачественное новообразование, вирусная инфекция и

аутоиммунное заболевание.

[007] Антитела изобретения могут быть непроцессированными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, фрагмент Fab, F(ab')₂ или scFv), и могут быть модифицированы, чтобы оказывать воздействие на функциональность, например, устранять остаточные эффекторные функции (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933). В некоторых вариантах осуществления, антитела могут являться биспецифическими.

[008] В первом аспекте, настоящее изобретение предоставляет изолированные рекомбинантные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PD-1. В некоторых вариантах осуществления, антитела являются полностью человеческими. Иллюстративные антитела против PD-1 настоящего изобретения перечислены в Таблицах 1-3 настоящего описания. В Таблице 1 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVRs), переменных областей легкой цепи (LCVRs), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител против PD-1. В Таблице 2 приведены идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител против PD-1. В Таблице 3 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи иллюстративных антител против PD-1.

[009] Настоящее изобретение предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую с ней, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

[010] Настоящее изобретение также предоставляет антитела

или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую с ней, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

[011] Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1, в паре любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных антител против PD-1, перечисленных в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления, пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/202, 218/202, 226/202, 234/202, 242/202, 250/202, 258/202, 266/202, 274/202, 282/202, 290/202, 298/186, 306/186 и 314/186. В некоторых вариантах осуществления, пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбирают из одной из SEQ ID NO: 130/138 (например, H2M7795N), 162/170 (например, H2M7798N), 234/202 (например, H4xH9048P), или 314/186 (например, H4xH9008P).

[012] Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в Таблице 1, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в Таблице 1, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в Таблице 1, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR1 легкой цепи, (LCDR1) содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в Таблице 1, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в Таблице 1, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR3,

перечисленных в Таблице 1, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей, перечисленных в Таблице 1, в паре любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в Таблице 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных антител против PD-1, перечисленных в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления, пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136/144 (например, H2M7795N), 168/176 (например, H2M7798N), 240/208 (например, H4xH9048P), и 320/192 (например, H4xH9008P).

Настоящее изобретение предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HC, перечисленных в Таблице 3, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, с ней, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LC, перечисленных в Таблице 3, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую с ней, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их

антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HC и LC (HC/LC), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HC, перечисленных в Таблице 3, в паре любой из аминокислотных последовательностей LC, перечисленных в Таблице 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HC/LC, содержащуюся в любом из иллюстративных антител против PD-1, перечисленных в Таблице 3. В некоторых вариантах осуществления, пару аминокислотных последовательностей HC/LC выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 330/331, 332/333, 334/335, и 336/337.

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор из шести CDR (т.е., HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в любом из иллюстративных антител против PD-1, перечисленных в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления, набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 132-134-136-140-142-144 (например, H2M7795N); 164-166-168-172-174-176 (например, H2M7798N); 236-238-240-204-206-208 (например, H4xH9048P); и 316-318-320-188-190-192 (например, H4xH9008P).

В связанном варианте осуществления, настоящее изобретение предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор из шести CDR (т.е., HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, определяемой любым из иллюстративных антител против PD-1, перечисленных в Таблице 1. Например, настоящее изобретение включает антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 130/138 (например, H2M7795N); 162/170 (например, H2M7798N); 234/202 (например, H4xH9048P); и 314/186 (например, H4xH9008P). Методы и технологии для идентификации CDR в аминокислотных

последовательностях HCVR и LCVR являются хорошо известными в данной области и могут применяться для идентификации CDR в обозначенных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрытых в настоящем описании. Иллюстративные договоренности, которые могут применяться для идентификации границ CDR, включают, например, определение Кабат, определение Хотиа и определение АбМ. В целом, определение Кабат основано на вариабельности последовательности, определение Хотиа основано на расположении структурных петлевых областях, и определение АбМ является компромиссом между подходами Кабат и Хотиа. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); и Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Общественные базы данных также являются доступными для идентификации последовательностей CDR в антителе.

Настоящее изобретение включает антитела против PD-1, имеющую модифицированную схему гликозилирования. В нескольких вариантах осуществления, может применяться модификация для удаления нежелательных участков гликозилирования, или для получения антитела без остатка фукозы, присутствующего в олигосахаридной, например, для увеличения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield *et al.* (2002) *JBC* 277:26733). В других применениях, может быть проведена модификация галактозилирования, чтобы модифицировать комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

Настоящее изобретение также предоставляет антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют за специфическое связывание с PD-1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержат CDR из HCVR и CDR из LCVR, где каждая из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в Таблице 1.

Настоящее изобретение также предоставляет изолированные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют связывание PD-1 с PD-L1 или PD-L2. В нескольких вариантах

осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые блокируют связывание PD-1 с PD-L1, могут связываться с таким же эпитопом на PD-1, как PD-L1, или могут связываться с эпитопом на PD-1, отличающимся от PD-L1.

В альтернативных вариантах осуществления, настоящее изобретение предоставляет антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые стимулируют связывание PD-1 с PD-L1. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предоставляет изолированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с PD-1, где антитела или их антигенсвязывающие фрагменты усиливают связывание PD-1 с PD-L1. В нескольких вариантах осуществления, изолированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат CDR из HCVR, где HCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 98, и 250; и CDR из LCVR, где LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 106, и 202. В нескольких вариантах осуществления, изолированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 (например, H1M7789N), 98/106 (например, H2M7791N), и 250/202 (например, H4H9068P2).

Настоящее изобретение также предоставляет антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PD-1 от человека или другого вида. В некоторых вариантах осуществления, антитела могут связываться с PD-1 человека и/или с PD-1 обезьяны.

Настоящее изобретение также предоставляет антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые перекрестно конкурируют за связывание PD-1 с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащими CDR из HCVR, и CDR из LCVR, где каждая из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в Таблице 1.

В одном варианте осуществления, изобретение предоставляет изолированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые

имеют одну или несколько из следующих характеристик: (a) блокирует связывание PD-1 с PD-L1 или PD-L2; (b) специфически связывается с PD-1 человека и/или PD-1 обезьяны; (c) блокирует PD-1-индуцированную Т-клеточную понижающую регуляцию и оберегает передачу сигналов Т-клеток; (d) подавляет рост опухоли и увеличивает выживаемость у субъектов с раком толстой и ободочной кишки; (e) ингибирует пролиферацию Т-клеток в аналитическом тесте со смешанной реакцией лимфоцитов (MLR); и (f) увеличивает секрецию IL-2 и/или интерферона-гамма в аналитическом тесте MLR.

В нескольких вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут специфически связываться с PD-1 агонистическим образом, т.е., они могут усиливать или стимулировать связывание с PD-1 и/или его активность; в других вариантах осуществления, антитело может специфически связываться с PD-1 антагонистическим образом, т.е., оно может блокировать PD-1 от связывания с его лигандом.

В некоторых вариантах осуществления, антитела или антигенсвязывающие фрагменты настоящего изобретения являются биспецифическими, включающими первую специфичность связывания с PD-1 и вторую специфичность связывания для второго целевого эпитопа. Второй целевой эпитоп может являться еще одним эпитопом на PD-1 или на различных белках. В некоторых вариантах осуществления, целевой эпитоп может находиться на различных клетках, включающих различные Т-клетки, В-клетки, опухолевые клетки, клетки аутоиммунной ткани или клетки, инфицированная вирусом.

Во втором аспекте, настоящее изобретение предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела против PD-1 или их части. Например, настоящее изобретение предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в Таблице 2, или по

существо аналогичную ей последовательность, имеющую с ней, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в Таблице 2, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую с ней, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот HCDR1, перечисленных в Таблице 2, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую с ней, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот HCDR2, перечисленных в Таблице 2, или по существу аналогичной ей последовательности имеющую с ней, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в Таблице 1; в

некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот HCDR3, перечисленных в Таблице 2, или по существу аналогичной ей последовательности имеющую с ней, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот LCDR1, перечисленных в Таблице 2, или по существу аналогичной ей последовательности имеющую с ней, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот LCDR2, перечисленных в Таблице 2, или по существу аналогичной ей последовательности имеющую с ней, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот LCDR3, перечисленных в Таблице 2, или по существу аналогичной ей последовательности имеющую с ней, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере,

99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR, где HCVR содержит набор из трех CDR (т.е., HCDR1-HCDR2-HCDR3), где набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 является таким, как определено любым из иллюстративных антител против PD-1, перечисленных в Таблице 1.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие LCVR, где LCVR содержит набор из трех CDR (т.е., LCDR1-LCDR2-LCDR3), где набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 является таким, как определено любым из иллюстративных антител против PD-1, перечисленных в Таблице 1.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты кодирующ как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность из любых аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность из любых аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в Таблице 2, или по существу аналогичной ей последовательности имеющую с ней, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновых кислот LCVR, перечисленных в Таблице 2, или по существу аналогичной ей последовательности имеющую с ней, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности. В некоторых вариантах осуществления в соответствии с этим аспектом изобретения, молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где как HCVR, так и LCVR получают из одного и того же антитела против PD-1, приведенного в Таблице 1.

Настоящее изобретение предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи, перечисленных в Таблице 3. Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей легкой цепи, перечисленных в Таблице 3.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие как тяжелую цепь (НС), так и легкую цепь (ЛС), где НС содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей НС, перечисленных в Таблице 3, и где ЛС содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей ЛС, перечисленных в Таблице 3.

В родственном аспекте, настоящее изобретение предоставляет рекомбинантные векторы экспрессии, способные к экспрессии полипептида, содержащего переменную область тяжелой или легкой цепи антитела против PD-1. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из молекул нуклеиновой кислоты, указанных выше, т.е., молекулы нуклеиновой кислоты кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, приведенных в Таблице 1. Настоящее изобретение также предоставляет рекомбинантные векторы экспрессии, способные к экспрессии полипептида, содержащего тяжелую или легкую цепь антитела против PD-1. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из молекул нуклеиновой кислоты, указанных выше, т.е., молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей тяжелой цепи или легкой цепи, приведенных в Таблице 3. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые такие векторы были введены, а также способы продуцирования антител или их частей посредством культивирования клеток-хозяев при условиях, обеспечивающих выработку антител или фрагментов антител, и извлечение антител и фрагментов антител, продуцируемых таким образом.

В третьем аспекте, настоящее изобретение предоставляет мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие первую антигенсвязывающую специфичность, которая специфически связывается с PD-1, и вторую антигенсвязывающую специфичность, которая специфически связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из опухолевого клеточно-специфичного антигена, ткане-специфичного антигена аутоиммунной ткани, специфичного антигена инфицированной клетки, Т-клеточного со-ингибитора, Т-клеточного рецептора, Fc рецептора, PD-L1 и PD-1. В некоторых вариантах осуществления, первая антигенсвязывающая специфичность может содержать три CDR, производные из HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из последовательностей HCVR в Таблице 1 и три CDR, производные из LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из последовательностей LCVR в Таблице 1. В одном варианте осуществления, первая антигенсвязывающая специфичность может содержать внеклеточный домен PD-L1. Вторая антигенсвязывающая специфичность может целенаправленно действовать на антиген в той же самой клетке, что и для PD-1, или в другой клетке такого же типа ткани или другого типа ткани. Например, мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы могут связываться с Т-клеткой, где первая антигенсвязывающая специфичность может специфически связываться с PD-1, а вторая антигенсвязывающая специфичность может связываться с Т-клеточным рецептором на Т-клетке. Альтернативно, в еще одном другом варианте осуществления, первая антигенсвязывающая специфичность может специфически связываться с PD-1 на Т-клетке, а вторая антигенсвязывающ специфичность может быть нацелена на антиген/рецептор на В-клетке или макрофаге или антигенпрезентирующей клетке. В некоторых вариантах осуществления, вторая антигенсвязывающая специфичность может быть направлена на антиген, ассоциированный с аутоиммунной тканью. В одном варианте осуществления, первая антигенсвязывающая специфичность может содержать внеклеточный домен PD-L1, а вторая антигенсвязывающая специфичность может

связываться с еще одним другим эпитопом на PD-1. В некоторых вариантах осуществления, первая антигенсвязывающая специфичность связывается с PD-1 с более низкой аффинностью, например, с K_D , большей, чем 10^{-7} М, большей, чем 10^{-6} М, большей, чем 10^{-5} М или большей, чем 10^{-4} М.

В четвертом аспекте, изобретение предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую рекомбинантное человеческое антитело или его фрагмент, которые специфически связываются с PD-1, и фармацевтически приемлемый носитель. В родственном аспекте, изобретение представляет композицию, которая представляет собой комбинацию антитела против PD-1 и второго терапевтического средства. В одном варианте осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, которое преимущественно комбинируется с антителом против PD-1. Иллюстративные средства, которые могут преимущественно комбинироваться с антителом против PD-1, включают, без ограничения, другие средства, которые связывают и/или модулируют сигнальный путь PD-1 (включающие другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, и т.д.) и/или средства, которые не связываются непосредственно с PD-1, но тем не менее модулируют активацию иммунных клеток. Дополнительные комбинационные терапии и совместные лекарственные формы, включающие антитела против PD-1 настоящего изобретения, раскрыты еще в других разделах настоящего описания.

В пятом аспекте, изобретение предоставляет способы модуляции иммунного ответа у субъекта, способы, включающие введение терапевтически эффективного количества антитела против PD-1 изобретения или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления, изобретение предоставляет способы усиления иммунного ответа у субъекта, способы, включающие введение субъекту эффективного количества антитела изобретения или его фрагмента, которые связываются с PD-1 и блокируют связывание PD-1 с PD-L1. В одном варианте осуществления, изобретение предоставляет способ стимуляции или усиления стимуляции Т-клеток у субъекта. В одном варианте осуществления, изобретение

предоставляет способы ингибирования Т-регуляторных (Treg) клеток у субъекта, способы, включающие введение терапевтически эффективного количества блокирующего антитела изобретения или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления, субъект, нуждающийся в этом, может страдать от заболевания или расстройства, таких как злокачественное новообразование или вирусная инфекция. В альтернативных вариантах осуществления, изобретение предоставляет способы ингибирования или подавления активации Т-клеток у субъекта, способы, включающие введение терапевтически эффективного количества активирующего антитела изобретения или его фрагмента субъекту, нуждающемуся в этом. В одном варианте осуществления, субъект может страдать от аутоиммунного заболевания или расстройства.

В шестом аспекте, изобретение предоставляет терапевтические способы для лечения заболевания или расстройства, такого как злокачественное новообразование, аутоиммунное заболевание или вирусная инфекция, у субъекта, с использованием антитела против PD-1 или антигенсвязывающей части антитела изобретения, где терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, соодержащей антитело или фрагмент антитела изобретения, субъекту, нуждающемуся в этом. Расстройство, подвергаемое лечению, представляет собой любое заболевание или состояние, которое улучшается, облегчается, ингибируется или предотвращается посредством стимуляции или ингибирования активности или сигнального пути PD-1. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент изобретения вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством субъекту, нуждающемуся в этом. Второе терапевтическое средство может быть выбрано из группы, состоящей из антитела к еще одному другому Т-клеточному со-ингибитору, антитела к антигену опухолевых клеток, антитела к Т-клеточному рецептору, антитела к Fc рецептору, антитела к эпитопу на клетке, инфицированной вирусом, антитела к антигену аутоиммунной ткани, антитела к PD-L1, цитотоксического

средства, средства против злокачественного новообразования, противовирусного лекарственного средства, противовоспалительного лекарственного средства (например, кортикостероидов), химиотерапевтического средства, лучевой терапии, иммуносупрессанта и любых других лекарственных средств или терапий, известных в данной области. В некоторых вариантах осуществления, второе терапевтическое средство может представлять собой средство, которое помогает протвodeйствовать или снижать любые возможные побочные эффект (эффекты), ассоциированные с антителом изобретения или его антигенсвязывающим фрагментом, если такие побочные эффект (эффекты) будут иметь место.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предоставляет способы подавления роста опухоли. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предоставляет способы увеличения выживаемости пациентов со злокачественным новообразованием. Примеры злокачественного новообразования включают, но не ограничиваются перечисленным, первичное и/или рецидивирующее злокачественное новообразование, включая рак мозга (например, мультиформную глиобластому), рак легких (например, немелкоклеточный рак легких), плоскоклеточный рак области головы и шеи, почечно-клеточную карциному, меланому, множественную миелому, рак простаты и рак толстой кишки. Способы включают введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антитела против PD-1 настоящего изобретения в комбинации со вторым терапевтическим средством, выбранным из группы, состоящей из антагониста фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) (например, афлиберцепта, бевацизумаб), ингибитора ангиопоэтина-2 (Ang2) (например, антитела против Ang2, такого как несвакумаб), ингибитора гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3), ингибитора антигена цитотоксических Т-лимфоцитов 4 (CTLA-4) (например, ипилимумаб), химиотерапевтического средства и лучевой терапии. Дополнительные примеры дополнительных терапий/терапевтических средств, которые могут применяться в комбинации с антителом против PD-1 изобретения для применения при лечении

злокачественного новообразования, описаны где-либо еще в настоящем описании.

Антитело или его фрагмент могут вводиться подкожно, внутривенно, внутрикожно, внутрибрюшинно, перорально, внутримышечно или интракраниально. Антитело или его фрагмент могут вводиться при дозе, равной от приблизительно 0,1 мг/кг массы тела до приблизительно 100 мг/кг массы тела субъекта.

Настоящее изобретение также включает применение антитела против PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента изобретения в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, которое имело бы положительный эффект от блокады или увеличения связывания с PD-1 и/или передачи сигналов.

Другие варианты осуществления станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1 представляет собой схематическое изображение биотеста на PD-1 на основе люциферазы, описанного в Примере 8 данного документа. Панель А: Неактивные клетки Юркат; Панель В: Клетки Юркат активируются Т-клеточным рецептором (TCR), образующим кластер посредством биспецифического антитела CD3xCD20; Панель С: активация PD-1 ослабляет ответ у активированных клеток Юркат; Панель D: Блокирование PD-1 спасает ответ у активированных клеток Юркат.

Фиг. 2 иллюстрирует рост опухоли и результаты по выживаемости для мышей с имплантированными опухолевыми клетками Colon-26 на День 0 и мышей, прошедших лечение указанными комбинациями молекул посредством инъекции в Дни 3, 6, 10, 13 и 19 ("модель опухоли на ранней стадии"). График отображает объем опухоли (в мм³) для различных экспериментальных групп при различных временных отметках после имплантации. Верхние стрелки вдоль X-оси указывают на временной режим лечебных инъекций. "mIgG2a" представляет собой изотипический контроль IgG2; "Fc" является человеческим Fc контролем; "VEGF-Ловушка" представляет собой афлиберцепт; "против-PD-1" представляет собой антитело против мышинового PD-1 клона RPMI-14; "против-PD-L1" представляет

собой моноклональное антитело против PD-L1, описанное в другом разделе настоящего описания.

Фиг. 3 иллюстрирует рост опухоли и результаты по выживаемости для мышей с имплантированными опухолевыми клетками Colon-26 на День 0 и мышей, прошедших лечение указанными комбинациями молекул посредством инъекции в Дни 3, 6, 10, 13 и 19 ("модель опухоли на ранней стадии"). График отображает объем опухоли (в мм³) индивидуальных мышей в каждой экспериментальной группе в День 28 после имплантации. "mIgG2a" представляет собой изотипический контроль IgG2; "Fc" является человеческим Fc контролем; "VEGF-Ловушка" представляет собой афлиберцепт; "против-PD-1" представляет собой антитело против мышиного PD-1 клона RPMI-14; "против-PD-L1" представляет собой моноклональное антитело против PD-L1, описанное в другом разделе настоящего описания.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Перед тем, как способы настоящего изобретения будут описаны, следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, так как такие способы и условия могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем описании, применяется только в целях описания конкретных вариантов осуществления, и не подразумевается как ограничивающая, так как объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не определено иным образом, все технические и научные термины, используемые в данном описании, имеют такое значение, которое обычно является понятным для рядового специалиста в данной области, к которой принадлежит это изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем способам и материалам, которые описаны в данном документе и могут применяться при практической реализации или тестировании настоящего изобретения, сейчас описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, указанные в данном описании, полностью включены в него посредством ссылки.

Термин "PD-1" относится к белку программируемой смерти-1, Т-клеточному со-ингибитору, также известному как CD279. Аминокислотная последовательность непротессированного PD-1 предоставлена в GenBank под учетным номером NP_005009,2 и также называется в данном описании SEQ ID NO: 327. Термин "PD-1" также включает белковые варианты PD-1, имеющие аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 321, 322, 323, или 324. Термин "PD-1" включает рекомбинантный PD-1 или его фрагмент. Термин также охватывает PD-1 или его фрагмент, сочетанный, например, с гистидиновой меткой, мышинным или человеческим Fc или сигнальной последовательностью, такой как ROR1. Например, термин включает последовательности, демонстрируемые SEQ ID NO: 323 или 324, содержащими мышиный Fc (mIgG2a) или человеческий Fc (hIgG1) по С-концу, сочетанный с аминокислотными остатками 25-170 непротессированного PD-1 с C93S изменением. Белковые варианты, как демонстрирует SEQ ID NO: 321, содержат гистидиновую метку по С-концу, сочетанную с аминокислотными остатками 25-170 непротессированного PD-1. Если не обозначено, что он принадлежит нечеловеческому виду, термин "PD-1" означает PD-1 человека.

PD-1 является членом семейства CD28/CTLA-4/ICOS Т-клеточных соингибиторов. PD-1 представляет собой белок из 288 аминокислот с внеклеточным N-концевым доменом, который является IgV-подобным, трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом, содержащим иммунорецепторный ингибиторный (ITIM) мотив на основе тирозина и иммунорецепторный переключающий (ITSM) мотив на основе тирозина (Chattopadhyay et al 2009, Immunol. Rev.). PD-1 рецептор имеет два лиганда, PD-лиганд-1 (PD-L1) и PD-L2.

Термин "PD-L1" относится к лиганду рецептора PD-1, также известный как CD274 и B7H1. Аминокислотная последовательность непротессированного PD-L1 предоставлена в GenBank под учетным номером NP_054862,1 и также называется в настоящем описании как SEQ ID NO: 328. Термин также охватывает PD-L1 или его фрагмент, сочетанный, например, с гистидиновой меткой, мышинным или человеческим Fc или сигнальной последовательностью, такой как

ROR1. Например, термин включает последовательности, иллюстрированные SEQ ID NO: 325 или 326, содержащими мышиный Fc (mIgG2a) или человеческий Fc (hIgG1) по С-концу, сочетанные с аминокислотными остатками 19-239 непроцессированного PD-L1. PD-L1 представляет собой белок из 290 кислот с внеклеточным IgV-подобным доменом, трансмембранным доменом и в высокой степени консервативным внутриклеточным доменом из приблизительно 30 аминокислот. PD-L1 конститутивно экспрессируется в многих клетках, таких как антигенпрезентирующие клетки (например, дендритные клетки, макрофаги и В-клетки) и в гемопоэтических и негемопоэтических клетках (например, клетках сосудистого эндотелия, островках Лангерганса и участках с иммунной привилегией). PD-L1 также экспрессируется в самых разнообразных опухолях, клетках, инфицированных вирусом и аутоиммунной ткани, и является компонентом иммуносупрессорной среды (Ribas 2012, NEJM 366: 2517-2519).

Как используют в настоящем описании, термин "Т-клеточный соингибитор" относится к лиганду и/или рецептору, который модулирует иммунный ответ через активацию или супрессию Т-клеток. термин "Т-клеточный со-ингибитор", также известный как Т-клеточная сосигнальная молекула, включает, но не ограничен приведенным, белок гена 3 активации лимфоцитов (LAG-3, также известный как CD223), цитотоксичный антиген-4 Т-лимфоцитов (CTLA-4), и ослабитель В- и Т-лимфоцитов (BTLA), CD-28, 2B4, LY108, Т-клеточный иммуноглобулин и муцин 3 (TIM3), Т-клеточный иммунорецептор с иммуноглобулином и ITIM (TIGIT; также известный как VSIG9), ассоциированный с лейкоцитами иммуноглобулин-подобный рецептор 1 (LAIR1; также известный как CD305), индуцируемый Т-клеточный костимулятор (ICOS; также известный как CD278), V-домен Ig супрессора активации Т-клеток (VISTA) и CD160.

Как используют в настоящем описании, термин "Fc рецептор" относится к белку поверхностного рецептора, обнаруживаемому на иммунных клетках, включающих В-лимфоциты, естественные клетки-киллеры, макрофаги, базофилы, нейтрофилы и тучные клетки, который имеет специфичность связывания с Fc областью антитела.

Термин "Fc рецептор" включает, но не ограничен приведенным, Fc γ рецептор [например, Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32), Fc γ RIIB (CD32), Fc γ RIIIA (CD16a), и Fc γ RIIIB (CD16b)], Fc α рецептор (например, Fc α RI или CD89) и Fc ϵ рецептор [например, Fc ϵ RI, и Fc ϵ RII (CD23)].

Термин "антитело", как используют в настоящем описании, предназначено для обозначения иммуноглобулиновых молекул, составленных из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, взаимосвязанных дисульфидными связями (т.е., "полных молекул антител"), а также их мультимеров (например, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь составлена из переменной области тяжелой цепи ("HCVR" или "V_H") и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь составлена из переменной области легкой цепи ("LCVR или "V_L") и константной области легкой цепи (C_L). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), попеременно с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В некоторых вариантах осуществления изобретения, FR антитела (или антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичными человеческим эмбриональным последовательностям, или могут быть естественным образом или искусственно модифицированы. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе сравнительного анализа двух или более CDR.

Замена одного или нескольких остатков CDR или пропуск одной или нескольких CDR также являются возможными. В научной литературе были описаны антитела, в которых одна или две CDR могут быть обходиться без связывания. Padlan *et al.* (1995 FASEB J. 9:133-139) анализировали контактные области между антителами и их антигенами, на основании опубликованных кристаллических

структур, и сделали вывод, что только приблизительно от одной пятой до одной трети остатков CDR в действительности контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил много антител, в которых одна или две CDR не имели аминокислот в контакте с антигеном (см. также, Vajdos *et al.* 2002 *J Mol Biol* 320:415-428).

Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, могут быть идентифицированы на основании предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 часто не требуются), из областей CDR по Кэбат, лежащих вне CDR по Хотиа, посредством молекулярного моделирования и/или эмпирически. Если CDR или ее остаток (остатки) пропущены, она обычно заменяется на аминокислоту, занимающую соответствующее положение в еще одной последовательности человеческого антитела или консенсусе таких последовательностей. Положения для замены внутри CDR и аминокислоты для замены также могут быть выбраны эмпирически. Эмпирические замены могут являться консервативными или неконсервативными заменами.

Полностью человеческие моноклональные антитела против PD-1, раскрытые в данном описании, могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасной и/или вариабельных доменах CDR областей тяжелой и легкой цепи в сравнении с соответствующими эмбриональными последовательностями. Такие мутации могут быть легко установлены посредством сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном описании с эмбриональными последовательностями, доступными из, например, общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые являются производными от любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном описании, где одна или несколько аминокислот внутри одной или нескольких каркасных и/или CDR областей подвергаются мутации до соответствующих остатка (остатков) эмбриональной последовательности, из которой антитело было получено, или до соответствующих остатка (остатков) еще одной человеческой

эмбриональной последовательности или до замены консервативной аминокислоты из соответствующих эмбриональных остатка (остатков) (такие изменения последовательности именуется в данном описании, как "эмбриональные мутации"). Рядовой специалист в данной области, начиная с последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепи, раскрытых в данном описании, сможет легко получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько индивидуальных эмбриональных мутаций или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, все из каркасных и/или CDR остатков в доменах V_H и/или V_L подвергаются обратной мутации до остатков, обнаруживаемых в исходной эмбриональной последовательности из которой антитело было получено. В других вариантах осуществления, только некоторые остатки мутируют обратно к исходной эмбриональной последовательности, например, только мутировавшие остатки, обнаруженные в пределах первых 8 аминокислот of FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только мутировавшие остатки, обнаруженные в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления, один или несколько из каркасных и/или CDR остатков мутируют в соответствующие остатки отличающейся эмбриональной последовательности (т.е., эмбриональной последовательности, которая отличается от эмбриональной последовательности, из которой антитело было первоначально получено). Кроме того, антитела настоящего изобретения могут содержать любую комбинацию из двух или нескольких эмбриональных мутаций в пределах каркасной и/или CDR областей, например, где некоторые индивидуальные остатки мутируют в соответствующий остаток конкретной эмбриональной последовательности, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной эмбриональной последовательности поддерживаются или мутируют в соответствующий остаток другой эмбриональной последовательности. Сразу после получения, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько эмбриональных мутаций, могут быть легко протестированы на одно или несколько желательных свойств, таких

как, улучшенная специфичность связывания, увеличенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в некоторых случаях), сниженная иммуногенность, и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим способом, охватываются настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также включает полностью человеческие моноклональные антитела против PD-1, содержащие варианты любых из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых здесь, имеющих одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает антитела против PD-1, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR, и/или CDR с, например, 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т.д. консервативных аминокислотных замен относительно любых из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR, и/или CDR, раскрытых здесь.

Термин "человеческое антитело", как используют в настоящем описании, подразумевает включение антител, имеющих переменные и константные области, полученные из человеческих эмбриональных последовательностей иммуноглобулинов. Человеческие mAb изобретения могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими эмбриональными последовательностями иммуноглобулинов (например, мутации, вводимые посредством случайного или сайт-специфичного мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, конкретно, в CDR3. Однако, термин "человеческое антитело", как используют в настоящем описании, не предназначен для включения mAb, в которых последовательности CDR, полученные из эмбриональной линии еще одного вида млекопитающего (например, мыши), были привиты на человеческие последовательности FR. Термин включает антитела, рекомбинантно полученные в млекопитающем, не являющемся человеком, или в клетках млекопитающего, не являющегося человеком. Термин не предназначен для включения антител, изолированных из человеческого субъекта, или генерируемых в нем.

Термин "рекомбинантное", как используют в настоящем

описании, относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам изобретения, созданным, экспрессированным, изолированным или полученным посредством технологий или способов, известных в области, таких как технология рекомбинантных ДНК, которая включает, *например*, сплайсинг ДНК и трансгенную экспрессию. Термин относится к антителам, экспрессируемым у млекопитающего, не являющегося человеком (включающего трансгенных нечеловеческих млекопитающих, *например*, трансгенных мышей), или клеточную (*например*, в клетках CHO) систему экспрессии, или изолированным из комбинаторной библиотеки рекомбинантных человеческих антител.

Термин "мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы", как используют в настоящем описании, относится к биспецифическим, триспецифическим или мультиспецифическим антигенсвязывающим молекулам и их антигенсвязывающим фрагментам. Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы могут быть специфичными для различных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные для эпитопов более чем одного целевого полипептида. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула может представлять собой одиночный мультифункциональный полипептид, или она может являться мультимерным комплексом из двух или более полипептидов, которые ковалентно или нековалентно ассоциированы друг с другом. Термин "мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы" включает антитела настоящего изобретения, которые могут быть связаны или совместно экспрессироваться с еще одной функциональной молекулой, *например*, еще одним пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (*например*, посредством химического сочетания, генетической гибридизации, нековалентной ассоциации или иначе) с одним или несколькими другими молекулярными объектами, такими как белок или его фрагмент, для получения биспецифической или мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы со второй специфичностью связывания. В соответствии с настоящим изобретением, термин "мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы" также

включает биспецифические, триспецифические или мультиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления, антитело настоящего изобретения является функционально связанным с еще одним антителом или его антигенсвязывающим фрагментом для получения биспецифического антитела со второй специфичностью связывания. Биспецифические и мультиспецифические антитела настоящего изобретения описаны в других разделах настоящего описания.

Термин "специфически связывается" или "специфически связывается с", или т.п., означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно стабильным при физиологических условиях. Специфичное связывание может характеризоваться равновесной константой диссоциации, равной, по меньшей мере, приблизительно 1×10^{-8} М или менее (например, более низкая K_D означает более плотное связывание). Методы определения того, связываются ли две специфически две молекулы, хорошо известны в области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Как описано здесь, антитела идентифицировали посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, который связывается специфически с PD-1. Более того, мультиспецифические антитела, которые связываются с одним доменом в PD-1 и одним или несколькими дополнительными антигенами или биспецифическая молекула, которая связывается с двумя различными областями PD-1, тем не менее считаются антителами, которые "специфически связываются", как используют в настоящем описании.

Термин "высокая аффинность" антитела относится к mAb, имеющим аффинность связывания с PD-1, выражаемую как K_D , равную, по меньшей мере, 10^{-7} М; предпочтительно 10^{-8} М; более предпочтительно, 10^{-9} М, даже более предпочтительно 10^{-10} М, даже более предпочтительно, 10^{-11} М, измеренную посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™ или ELISA с аффинностью в растворе.

Термин "скорость замедления", "Koff" или "kd" означает антитело, диссоциирует из PD-1, константой скорости, равной $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или менее, предпочтительно $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или менее, как определяют поверхностным плазмонным резонансом, например, BIACORE™.

Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела, и т.п., как используют в настоящем описании, включают любой природный, ферментативно получаемый, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела", как используют в настоящем описании, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с PD-1.

В конкретных вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела изобретения может быть конъюгирован с фрагментом, таким как лиганд или терапевтический фрагмент ("иммуноконъюгат"), такой как антибиотик, второе антитело против PD-1 или антитело к еще одному антигену, такому как опухолеспецифичный антиген, антиген аутоиммунной ткани, антиген клетки, инфицированной вирусом, Fc рецептор, T-клеточный рецептор, или T-клеточный соингибитор, или иммунотоксин, или любой терапевтический фрагмент, примеимый для лечения заболевания или состояния, включающего злокачественное новообразование, аутоиммунное заболевание или хроническую вирусную инфекцию.

"Изолированное антитело", как используют в настоящем описании, предназначено для обозначения антитела, которое не содержит по существу других антител (Ab), имеющих различные антигенные специфичности (например, изолированное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его фрагмент, по существу не содержит Ab, которые специфически связывают антигены, отличные от PD-1.

"Блокирующее антитело" или "нейтрализующее антитело", как

используют в настоящем описании (или "антитело, которое нейтрализует активность PD-1" или "антагонистическое антитело"), предназначено для обозначения антитела, связывание которого с PD-1 приводит к ингибированию, по меньшей мере, одной биологической активности PD-1. Например, антитело изобретения может предотвращать или блокировать связывание PD-1 с PD-L1.

"Активирующее антитело" или "усиливающее антитело", как используют в настоящем описании (или "агонистическое антитело"), предназначено для обозначения антител, связывание которого с PD-1 приводит к увеличению или стимуляции, по меньшей мере, одной биологической активности of PD-1. Например, антитело изобретения может увеличивать связывание PD-1 с PD-L1.

Термин "поверхностный плазмонный резонанс", как используют в настоящем описании, относится к оптическому явлению, которое делает возможным исследование биомолекулярных взаимодействий в режиме реального времени посредством обнаружения изменений концентраций белка в матрице биосенсора, например, используя систему VIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden и Piscataway, N.J.).

Термин " K_D ", как используют в настоящем описании, предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует с конкретным участком связывания антигена в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Одиночный антиген может иметь более, чем один эпитоп. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут иметь различные биологические эффекты. Термин "эпитоп" также относится к участку на антигене, на который реагируют В- и/или Т-клетки. Он также относится к области антигена, которая связывается антителом. Эпитопы могут быть определены, как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы обычно представляют собой подвид структурных эпитопов и имеют такие остатки,

которые непосредственно способствуют аффинности взаимодействия. Эпитопы могут также быть конформационными, то есть, состоящими из нелинейных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, эпитопы могут включать детерминанты, которые являются химически активными поверхностными группировками молекул, таких как аминокислоты, сахарные боковые цепи, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и, в некоторых вариантах осуществления, могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики, и/или специфические характеристики заряда.

Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичные", когда относят к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с еще одной нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью), существует нуклеотидная идентичность последовательности на, по меньшей мере, приблизительно 90%, и, более предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, измеренная посредством любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательности, такого как FASTA, BLAST или GAP, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может, в некоторых случаях, кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу аналогичную аминокислотную последовательность, как полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Применимо к полипептидам, термин "существенное сходство" или "по существу аналогичная" означает, что две пептидных последовательности, при оптимальном выравнивании, таком как посредством программ GAP или BESTFIT с использованием гзп-масс по умолчанию, разделяют, по меньшей мере, 90% идентичности последовательности, даже более предпочтительно, по меньшей мере, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, различаются консервативными заменами аминокислот. "Консервативная замена аминокислоты" является заменой, при которой аминокислотный остаток заменяется еще одним

аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка. В случаях, где две или несколько аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень сходства могут регулироваться с повышением для коррекции консервативной природы замены. Средства проведения таких регулировок хорошо известны специалистам в области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, которая включена в настоящее описание посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными консервативными аминокислотными заменяющими группами являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице лог-подобия PAM250, раскрытой в Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-45, включенной здесь посредством ссылки. "Умеренно консервативная" замена представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице лог-подобия PAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов обычно измеряют, используя программное обеспечение анализа последовательностей. Программное обеспечение анализа белка совмещает сходные последовательности с использованием измерений сходства, относимого к различным заменам, делециям и другим модификациям, включающим консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие

как GAP и BESTFIT, которые могут применяться с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от организмов различных видов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG Version 6,1. Полипептидные последовательности также могут сравниваться с использованием FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендованными параметрами; программа в GCG Version 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) предоставляет выравнивание и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между запрашиваемой и поисковой последовательностями (Pearson (2000) *выше*). Еще один предпочтительный алгоритм при сравнении последовательности изобретения с базой данных, содержащей большое число последовательностей от различных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно, BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки.

Фраза "терапевтически эффективное количество" означает количество, которое производит желательный эффект, для которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения, и будет устанавливаться специалистом в области с использованием известных методов (см., например, Lloyd (1999) *Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Как используют в настоящем описании, термин "субъект" относится к животному, предпочтительно, млекопитающему, нуждающемуся в снижении, предотвращении и/или лечении заболевания или расстройства, такого как хроническая вирусная инфекция, злокачественное новообразование или аутоиммунное заболевание.

Как используют в настоящем описании, "противоопухолевое средство" означает любое средство, применимое для лечения злокачественного новообразования, включающего, но не

ограниченного перечисленным, цитотоксины и средства, такие как антиметаболиты, алкилирующие средства, антрациклины, антибиотики, антимитотические средства, прокарбазин, гидроксимочевину, аспарагиназу, кортикостероиды, митотан (O,P'-(DDD)), биологические средства (например, антитела и интерфероны) и радиоактивные вещества. Как используют в настоящем описании, "цитотоксин или цитотоксическое средство", также относится к химиотерапевтическому средству и означает любое средство, которые оказывает на клетки вредное воздействие. Примеры включают Taxol® (паклитаксел), темозоламид, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, цисплатин, митомицин, этопозид, тенопрзид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин и их аналоги или гомологи.

Как используют в настоящем описании, термин "противовирусное средство" относится к любому лекарственному средству или терапии, применяемой для лечения, предотвращения, или уменьшения вирусной инфекции у субъекта-хозяина. Термин "противовирусное средство" включает, но не ограничен приведенным, зидовудин, ламивудин, абакавир, рибавирин, лопинавир, эфавиренц, кобицистат, тенофовир, рилпивирин, анальгетики и кортикостероиды. В контексте настоящего изобретения, вирусные инфекции включают долговременные или хронические инфекции, вызываемые вирусами, включающими, но не ограниченными приведенным, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус гепатита В (HBV), вирус гепатита С (HCV), вирус папилломы человека (HPV), вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) и вирус иммунодефицита обезьяны (SIV).

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты настоящего изобретения специфически связываются с PD-1 и модулируют взаимодействие PD-1 с PD-L1. Антитела против PD-1 могут связываться с PD-1 с высокой аффинностью или с низкой аффинностью. В некоторых вариантах осуществления, антитела настоящего изобретения могут являться блокирующими антителами,

где антитела могут связываться с PD-1 и блокировать взаимодействие PD-1 с PD-L1. В нескольких вариантах осуществления, блокирующие антитела изобретения могут блокировать связывание PD-1 с PD-L1 и/или стимулировать или усиливать активацию Т-клеток. В нескольких вариантах осуществления, блокирующие антитела могут применяться для стимуляции или усиления иммунного ответа и/или для лечения субъекта, страдающего от злокачественного новообразования или хронической вирусной инфекции. Антитела при введении субъекту, нуждающемуся в этом, могут снижать хроническую инфекцию, вызываемую вирусом, таким как HIV, LCMV или HBV у субъекта. Они могут применяться для ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта. Они могут применяться по отдельности или в качестве вспомогательной терапии с другими терапевтическими фрагментами или модальностями, известными в области для лечения злокачественного новообразования или вирусной инфекции.

В других вариантах осуществления, антитела настоящего изобретения могут представлять собой активирующие антитела, где антитела могут связываться с PD-1 и усиливать взаимодействие PD-1 и PD-L1. В нескольких вариантах осуществления, активирующие антитела могут усиливать связывание PD-1 с PD-L1 и/или ингибировать или подавлять активацию Т-клеток. Активирующие антитела настоящего изобретения могут быть применимыми для ингибирования иммунного ответа у субъекта и/или для лечения аутоиммунного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления, антитела против PD-1 могут представлять собой мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, где они содержат первую специфичность связывания с PD-1 и вторую специфичность связывания с антигеном, выбранным из группы, состоящей из еще одного Т-клеточного соингибитора, антигена аутоиммунной ткани, Т-клеточного рецептора, Fc рецептора, Т-клеточного рецептора, PD-L1 и другого эпитопа из PD-1.

В некоторых вариантах осуществления, антитела изобретения получают из мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как непротессированный PD-1 [См. GenBank учетный номер

NP_005009,2 (SEQ ID NO: 327)] или рекомбинантной формой PD-1 или модифицированными фрагментами PD-1 человека (SEQ ID NO: 321, 323 или 324) или модифицированными фрагментами PD-1 обезьяны (SEQ ID NO: 322), с последующей иммунизацией вторичным иммуногеном или иммуногеном активным фрагментом PD-1.

Имуноген может представлять собой биологически активный и/или иммуногенный фрагмент PD-1 или ДНК, кодирующую его активный фрагмент. Фрагмент может быть получен из N-концевого или C-концевого домена PD-1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммуноген является фрагментом PD-1, который находится в интервале аминокислотных остатков 25-170 из SEQ ID NO: 327 с изменением С93S.

Пептиды могут быть модифицированы для включения присоединения или замены некоторых остатков для мечения или для целей конъюгации с молекулами носителями, такими как, KLH. Например, цистеин может быть присоединен либо по N-терминальному или C-терминальному концу пептида, или линкерная последовательность может быть добавлена для получения пептида для конъюгации, например, с KLH для иммунизации.

Непроцессированная аминокислотная последовательность непроцессированного PD-1 человека показана как SEQ ID NO: 327.

В некоторых вариантах осуществления, антитела которые специфически связываются с PD-1, могут быть получены с использованием фрагментов указанных выше областей, или пептидов, которые находятся вне обозначенных областей на приблизительно 5-20 аминокислотных остатков от каждого из, или обоих, N- или C- терминальных концов областей, описанных здесь. В некоторых вариантах осуществления, любая комбинация указанных выше областей или их фрагментов может применяться при получении PD-1-специфичных антител. В некоторых вариантах осуществления, любая одна или несколько из указанных выше областей PD-1, или их фрагментов, может применяться для получения моноспецифических, биспецифических или мультиспецифических антител.

Некоторые антитела против PD-1 настоящего изобретения способны связываться с PD-1 и нейтрализовать его активность,

как определяют посредством тестов *in vitro* или *in vivo*. Способность антител изобретения связываться с PD-1 и нейтрализовать его активность может быть измерена с использованием любых стандартных методов, известных специалистам в области, включающих тесты на связывание, или тесты на активность, как описано здесь.

Неограничивающие, иллюстративные тесты *in vitro* для измерения активности связывания иллюстрируются в Примерах в настоящем описании. В Примере 3, аффинности связывания и кинетические константы человеческих антител против PD-1 для PD-1 человека и PD-1 обезьяны определяли посредством поверхностного плазмонного резонанса и измерения проводили на приборе Biacore 4000 или T200. В Примерах 4 и 5, тесты на блокирование применяли для определения способности антител против PD-1 блокировать PD-L1-связывающую способность PD-1 *in vitro*. В Примере 6, тесты на блокирование применяли для определения перекрестной конкуренции между антителами против PD-1. Пример 7 описывает связывание антител с клетками, сверхэкспрессирующими PD-1. В Примере 8, люциферазный тест применяли для определения способности антител против PD-1 антагонизировать сигнальный путь PD-1/PD-L1 в Т-клетках.

В некоторых вариантах осуществления, антитела настоящего изобретения способны усиливать или стимулировать активацию Т-клеток *in vitro* и у субъекта со злокачественным новообразованием или у субъекта, инфицированного вирусом, таким как LCMV. В некоторых вариантах осуществления, антитела настоящего изобретения применяют в комбинации со вторым терапевтическим средством, таким как антитело ко второму Т-клеточному соингибитору, для усиления иммунного ответа и ингибирования роста опухоли у субъекта.

Антитела, специфичные к PD-1, могут не содержать дополнительных меток или фрагментов, или они могут содержать N-концевые или C-концевые метку или фрагмент. В одном варианте осуществления, меткой или фрагментом является биотин. В тесте на связывание, положение метки (если она имеется) может определять ориентацию пептида относительно поверхности, над

которой пептид связан. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован таким образом, что C-концевая часть пептида будет удалена от поверхности. В одном варианте осуществления, метка может представлять собой радионуклид, флуоресцентный краситель или МРТ-обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах осуществления, такие меченые антитела могут применяться в диагностических аналитических тестах, включающих тесты с визуализацией.

Антигенсвязывающие фрагменты антител

Если конкретно не указано иначе, термин "антитело", как используют в настоящем описании, следует понимать, как охватывающий молекулы антитела, содержащие две тяжелых цепи иммуноглобулина и две легких цепи иммуноглобулина (т.е., "молекулы полного антитела"), а также их антигенсвязывающей фрагменты. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела, и т.п, как используют в настоящем описании, включают любой природный, получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела", как используют в настоящем описании, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с PD-1. Фрагмент антитела может включать Fab фрагмент, F(ab')₂ фрагмент, Fv фрагмент, dAb фрагмент, фрагмент, содержащий CDR, или изолированную CDR. В некоторых вариантах осуществления, термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептидному фрагменту мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы. В таких вариантах осуществления, термин "антигенсвязывающий фрагмент" включает, например, внеклеточный домен PD-L1, который специфически связывается с PD-1. Антигенсвязывающие фрагменты антител могут быть получены, например, из молекул полного антитела, с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление, или методы рекомбинантной генетической инженерии,

включающие манипуляции и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и (необязательно) константные домены антитела. Такая ДНК является известной и/или легко доступной из, например, коммерческих источников, библиотек ДНК (включающих, например, библиотеки фаг-антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или посредством использования методов молекулярной биологии, например, для расположения одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации, или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или делеции аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab фрагменты; (ii) F(ab')₂ фрагменты; (iii) Fd фрагменты; (iv) Fv фрагменты; (v) одноцепочечные Fv (scFv) молекулы; (vi) dAb фрагменты; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гиперпеременную область антитела (например, изолированную область, определяющую комплементарность (CDR), такую как CDR3 пептид), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфичные антитела, однодоменные антитела, антитела с исключенным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетраатела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела, и т.д.), малые модулярные иммунофармацевтические средства (SMIP), и переменные IgNAR домены акулы, также охватываются выражением "антигенсвязывающий фрагмент", как его используют в настоящем описании.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела будет обычно содержать по меньшей мере, один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и будет обычно включать, по меньшей мере, одну CDR, которая является смежной или находится в рамке с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих V_H домен,

ассоциированный с V_L доменом, V_H и V_L домены могут находиться друг относительно друга в любом подходящем расположении. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры $V_H - V_H$, $V_H - V_L$ или $V_L - V_L$. Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V_H или V_L домен.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать, по меньшей мере, один переменный домен, ковалентно связанный, по меньшей мере, с одним константным доменом. Неограничивающие, иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела настоящего изобретения, включают: (i) V_H-C_H1 ; (ii) V_H-C_H2 ; (iii) V_H-C_H3 ; (iv) $V_H-C_H1-C_H2$; (v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (vi) $V_H-C_H2-C_H3$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2 ; (x) V_L-C_H3 ; (xi) $V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$; и (xiv) V_L-C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включающей любую из иллюстративных конфигураций, приведенных выше, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом или могут быть связаны посредством полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять из, по меньшей мере, 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связке между соседними переменными и/или константными доменами в единственной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела настоящего изобретения может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) с любыми конфигурациями переменного и константного домена, приведенными выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными V_H или V_L доменами (например, посредством дисульфидных связи (связей)).

Что касается молекул полного антитела, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела будет

обычно содержать, по меньшей мере, два различных переменных домена, где каждый переменный домен способен к специфичному связыванию с отдельным антигеном или с различными эпитопами на одном и том же антигене. Любой формат мультиспецифического антитела, включающий иллюстративные форматы биспецифического антитела, раскрытые здесь, могут быть адаптированы для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела настоящего изобретения, с использованием рутинных методов, доступных в данной области.

Получение человеческих антител

Способы генерации человеческих антител в трансгенных мышах являются известными в данной области. Любые такие известные способы могут применяться в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, которые специфически связываются с PD-1.

Иммуноген, содержащий любой из следующих, может применяться для генерации антител к PD-1. В некоторых вариантах осуществления, антитела изобретения получают из мышей, иммунизированных с использованием непроцессированного, нативного PD-1 (См. GenBank учетный номер NP_005009.2) (SEQ ID NO: 327), или с использованием рекомбинантного пептида PD-1. Альтернативно, PD-1 или его фрагмент могут быть получены с использованием стандартных биохимических методов и модифицированы (SEQ ID NO: 321-324) и применяться в качестве иммуногена.

В некоторых вариантах осуществления, иммуноген может представлять собой пептид из N-терминального или C-терминального конца PD-1. В одном варианте осуществления, иммуноген представляет собой внеклеточный домен или IgV-подобный домен PD-1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммуноген представляет собой фрагмент PD-1, который находится в приблизительном интервале аминокислотных остатков 25-170 из SEQ ID NO: 327 с изменением C93S.

В нескольких вариантах осуществления, иммуноген может представлять собой рекомбинантный пептид PD-1, экспрессируемый в *E. coli* или в любых других эукариотных клетках или клетках

млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомяка (СНО).

В некоторых вариантах осуществления, антитела, которые специфически связываются с PD-1, могут быть получены с использованием фрагментов отмеченных выше областей, или пептидов, которые находятся за пределами обозначенных областей на расстоянии приблизительно 5-20 аминокислотных остатков от каждого, или обоих, N- или C-терминальных концов областей, описанных здесь. В некоторых вариантах осуществления, любая комбинация из отмеченных выше областей или их фрагментов может применяться при получении PD-1-специфичных антител.

Применяя технологию VELOCIMMUNE® (см., например, US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любой другой известный метод генерации моноклональных антител, первоначально выделяют химерные антитела к PD-1 с высокой аффинностью, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Технология VELOCIMMUNE® включает генерацию трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий переменные области человеческих тяжелой и легкой цепей, функционально связанные с эндогенными локусами мышинной константной области, таким образом, что мышь продуцирует антитело, содержащее человеческую переменную область и мышиную константную область в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные области человеческих тяжелой и легкой цепей. ДНК затем экспрессируют в клетке, способной к экспрессии полностью человеческого антитела.

Биоэквиваленты

Антитела против PD-1 и фрагменты антител настоящего изобретения охватывают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые изменяются по сравнению с последовательностями описанных антител, но которые сохраняют способность связываться с PD-1. Такие варианты антител и фрагменты антител содержат одно или несколько дополнений,

делений или замен аминокислот при сравнении с родительской последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая является по существу эквивалентной активности описанных антител. Аналогично, последовательности ДНК, кодирующие антитела настоящего изобретения, охватывают последовательности, которые содержат одно или несколько дополнений, делеций или замен нуклеотидов при сравнении с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые по существу являются биоэквивалентными антителу или фрагменту антитела изобретения.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, чья скорость и степень всасывания не показывают значительного различия при введении при одинаковой молярной дозе в сходных экспериментальных условиях, либо однократной дозы или множественных доз. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они являются эквивалентными по степени их всасывания, но не по их скорости всасывания, и еще могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия по скорости всасывания являются намеренными и отражаются при мечении, не являются существенными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме при, например, хроническом применении, и считаются незначительными в медицинском отношении для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

В одном варианте осуществления, два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если не существует клинически значимых различий по их безопасности, чистоте или активности.

В одном варианте осуществления, два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может переключаться один или более раз между эталонным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого увеличения риска неблагоприятных эффектов, включающих клинически значимое изменение иммуногенности, или пониженную эффективность, в сравнении с продолжающейся терапией без такого переключения.

В одном варианте осуществления, два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют посредством общего механизма или механизмов действия для состояния или состояний применения, в той степени, в которой такие механизмы являются известными.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована методами *in vivo* и/или *in vitro*. Измерения биоэквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, у которых концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функцию от времени; (b) тест *in vitro*, который коррелировался и являлся обоснованно прогнозирующим данные по биодоступности у человека *in vivo*; (c) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, у которых соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют как функцию от времени; и (d) хорошо контролируемое клиническое испытание, которое устанавливает безопасность, эффективность действия или биодоступность или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител изобретения могут быть построены посредством, например, проведения различных замен остатков или последовательностей или делеции терминальных или внутренних остатков или последовательностей, не востребованных для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся существенными для биологической активности, могут быть подвергнуты делеции или заменены на другие аминокислоты, чтобы предотвратить образование ненужных или некорректных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах, биоэквивалентные антитела могут включать варианты антител, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые исключают или удаляют гликозилирование.

Антитела против PD-1, содержащие Fc варианты

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, предоставлены антитела против PD-1, содержащие Fc домен, содержащий одну или более мутаций, которые усиливают или ослабляют связывание антитела с рецептором FcRn,

например, при кислой pH в сравнении с нейтральной pH. Например, настоящее изобретение включает антитела против PD-1, содержащие мутацию в C_H2 или C_H3 области Fc домена, где мутация (мутации) увеличивает аффинность Fc домена к FcRn в кислой среде (*например*, в эндосоме, где pH находится в интервале от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке, при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, *например*, модификацию в положении 250 (*например*, E или Q); 250 и 428 (*например*, L или F); 252 (*например*, L/Y/F/W или T), 254 (*например*, S или T), и 256 (*например*, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (*например*, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (*например*, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (*например*, 308F, V308F), и 434. В одном варианте осуществления, модификация включает модификацию 428L (*например*, M428L) и 434S (*например*, N434S); 428L, 259I (*например*, V259I), и модификацию 308F (*например*, V308F); модификацию 433K (*например*, H433K) и 434 (*например*, 434Y); модификацию 252, 254, и 256 (*например*, 252Y, 254T, и 256E); модификацию 250Q и 428L (*например*, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (*например*, 308F или 308P). В еще одном другом варианте осуществления, модификация включает модификацию 265A (*например*, D265A) и/или 297A (*например*, N297A).

Например, настоящее изобретение включает антитела против PD-1, содержащие Fc домен, содержащий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (*например*, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (*например*, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (*например*, M428L и N434S); 257I и 311I (*например*, P257I и Q311I); 257I и 434H (*например*, P257I и N434H); 376V и 434H (*например*, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (*например*, T307A, E380A и N434A); и 433K и 434F (*например*, H433K и N434F). В одном варианте осуществления, настоящее изобретение включает антитела против PD-1, содержащие

Fc домен, содержащий мутацию S108P в шарнирной области IgG4 для инициации стабилизации димера. Все возможные комбинации приведенных выше мутаций Fc домена, и другие мутации в переменных доменах антитела, раскрытого здесь, подразумеваются в объеме настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также включает антитела против PD-1, содержащие химерную константную (C_H) область тяжелой цепи, где химерная C_H область содержит сегменты, являющиеся производными C_H областей из более, чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела изобретения могут содержать химерную C_H область, содержащую часть C_{H2} домена или весь C_{H2} домен, производный от молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в сочетании с частью C_{H3} домена или всем C_{H3} доменом, производного от молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитела изобретения содержат химерную C_H область имеющую химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать аминокислотную последовательность "верхнего шарнира" (аминокислотные остатки из положений 216-227 в соответствии с нумерацией EU), производную от шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в сочетании с последовательностью "нижнего шарнира" (аминокислотные остатки из положений 228-236 в соответствии с нумерацией EU) являющейся производной от шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, производные от верхнего шарнира человеческого IgG1 или человеческого IgG4, и аминокислотные остатки, производные от нижнего шарнира человеческого IgG2. Антитело, содержащее химерную C_H область, описанную в данном документе, может, в некоторых вариантах осуществления, проявлять эффекторные функции модифицированного Fc без оказания отрицательного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, USSN. 14/170,166, поданную 31 января 2014 г., раскрытие которой

полностью включено в настоящее описание посредством ссылки).

Биологические характеристики антител

В целом, антитела настоящего изобретения функционируют посредством связывания с PD-1. Настоящее изобретение включает антитела против PD-1 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают растворимые мономерные или димерные молекулы PD-1 с высокой аффинностью. Например, настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают мономерный PD-1 (например, при 25°C или при 37°C) с K_D , меньшей, чем приблизительно 50 нМ, измеренной посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата теста, определенного в Примере 3 настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают мономерный PD-1 с K_D , меньшей, чем приблизительно 40 нМ, меньшей, чем приблизительно 30 нМ, меньшей, чем приблизительно 20 нМ, меньшей, чем приблизительно 10 нМ, меньшей, чем приблизительно 5 нМ, меньшей, чем приблизительно 2 нМ или меньшей, чем приблизительно 1 нМ, измеренной посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата теста, определенного в Примере 3 настоящего описания, или по существу аналогичного теста.

Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают димерный PD-1 (например, при 25°C или при 37°C) с K_D меньшей, чем приблизительно 400 пМ, измеренной посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата теста, определенного в Примере 3 настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают димерный PD-1 с K_D , меньшей, чем приблизительно 300 пМ, меньшей, чем приблизительно 250 пМ, меньшей, чем приблизительно 200 пМ, меньшей, чем приблизительно 100 пМ или меньшей, чем приблизительно 50 пМ, измеренной посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата теста, определенного в

Примере 3 настоящего описания, или по существу аналогичного теста.

Настоящее изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты которые связывают PD-1 обезьяны (*Macaca fascicularis*) (например, при 25°C или при 37°C) с K_D , меньшей, чем приблизительно 35 нМ, измеренной посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата теста, определенного в Примере 3 настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают PD-1 обезьяны с K_D , меньшей, чем приблизительно 30 нМ, меньшей, чем приблизительно 20 нМ, меньшей, чем приблизительно 15 нМ, меньшей, чем приблизительно 10 нМ, или меньшей, чем приблизительно 5 нМ, измеренной посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата теста, определенного в Примере 3 настоящего описания, или по существу аналогичного теста.

Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают PD-1 с периодом половинной диссоциации ($t_{1/2}$) большим, чем приблизительно 1,1 минуты, измеренным посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C, например, с использованием формата теста, определенного в Примере 3 настоящего описания, или по существу аналогичного теста. В некоторых вариантах осуществления, антитела или антигенсвязывающие фрагменты настоящего изобретения связывают PD-1 с $t_{1/2}$, большим, чем приблизительно 5 минут, большим, чем приблизительно 10 минут, большим, чем приблизительно 30 минут, большим, чем приблизительно 50 минут, большим, чем приблизительно 60 минут, большим, чем приблизительно 70 минут, большим, чем приблизительно 80 минут, большим, чем приблизительно 90 минут, большим, чем приблизительно 100 минут, большим, чем приблизительно 200 минут, большим, чем приблизительно 300 минут, большим, чем приблизительно 400 минут, большим, чем приблизительно 500 минут, большим, чем приблизительно 600

минут, большим, чем приблизительно 700 минут, большим, чем приблизительно 800 минут, большим, чем приблизительно 900 минут, большим, чем приблизительно 1000 минут, или большим, чем приблизительно 1200 минут, измеренным посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C, например, с использованием формата теста, определенного в Примере 3 настоящего описания (например, формат mAb-захвата или антиген-захвата), или по существу аналогичного теста.

Настоящее изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют связывание PD-1 с PD-L1 с IC50, меньшей, чем приблизительно 3 нМ, определенной с использованием теста на основе иммуноанализа ELISA, например, как показано в Примере 4, или по существу аналогичного теста. Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с PD-1 и усиливают связывание PD-1 с PD-L1.

В нескольких вариантах осуществления, антитела настоящего изобретения могут связываться с внеклеточным доменом PD-1 или с фрагментом домена. В нескольких вариантах осуществления, антитела настоящего изобретения могут связываться с более, чем одним доменом (кросс-реактивные антитела). В некоторых вариантах осуществления, антитела настоящего изобретения могут связываться с эпитопом, расположенным во внеклеточном домене, содержащим аминокислотные остатки 21-171 PD-1 (SEQ ID NO: 327). В одном варианте осуществления, антитела могут связываться с эпитопом, содержащим одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков 1-146 из SEQ ID NO: 321-324.

В некоторых вариантах осуществления, антитела настоящего изобретения могут функционировать посредством блокирования или ингибирования PD-L1-связывающей активности, ассоциированной с PD-1 посредством связывания с любой другой областью или фрагментом непротессированного белка, аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID NO: 327. В некоторых вариантах осуществления, антитела могут ослаблять или

модулировать взаимодействие между PD-1 и PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления, антитела настоящего изобретения могут представлять собой биспецифические антитела. Биспецифические антитела изобретения могут связывать один эпитоп в одном домене и также могут связывать второй эпитоп в другом домене PD-1. В некоторых вариантах осуществления, биспецифические антитела изобретения могут связывать два различных эпитопа в одном и том же домене. В одном варианте осуществления, мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула включает первую специфичность связывания, где первая специфичность связывания включает внеклеточный домен или его фрагмент PD-L1; и вторую специфичность связывания с еще одним эпитопом из PD-1.

В одном варианте осуществления, изобретение предоставляет изолированное полностью человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с PD-1, где антитело или его фрагмент проявляет одну или несколько из следующих характеристик: (i) содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 218, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 306 и 314, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; (ii) содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, и 202, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; (iii) содержит домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 224, 232, 240, 248, 256, 264, 272, 280, 288, 296, 304, 312, и 320, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере,

мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; и домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192 и 208, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; (iv) содержит домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 220, 228, 236, 244, 252, 260, 268, 276, 284, 292, 300, 308 и 316, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 222, 230, 238, 246, 254, 262, 270, 278, 286, 294, 302, 310 и 318, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188 и 204, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; и домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, и 206, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; (v) представляет собой мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую первую специфичность связывания с PD-1 и вторую специфичность

связывания с антигеном, выбранным из группы, состоящей из PD-1, опухолеспецифичного антигена, специфичного антигена аутоиммунной ткани, антигена клетки, инфицированной вирусом, различного Т-клеточного соингибитора, Т-клеточного рецептора и Fc рецептора; (vi) связывается с PD-1 человека с K_D , равной приблизительно 28 пМ-1,5 мкМ; (vii) связывается с PD-1 обезьяны с K_D , равной приблизительно 3 нМ-7,5 мкМ; (viii) блокирует или усиливает связывание PD-1 с PD-L1 с $IC_{50} \leq$ приблизительно 3,3 нМ; (ix) блокирует PD-1-индуцированную Т-клеточную понижающую регуляцию и/или спасает сигнальный путь Т-клеток в тесте с Т-клетками/APC люциферазным репортером; (x) стимулирует пролиферацию и активность Т-клеток в тесте со смешанной реакцией лимфоцитов (MLR); (xi) индуцирует выработку IL-2 и/или IFN γ в аналитическом тесте MLR; и (xii) подавляет рост опухоли и увеличивает выживаемость у субъектов со злокачественным новообразованием.

В одном варианте осуществления, изобретение предоставляет изолированное полностью человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые блокируют связывание PD-1 с PD-L1, где антитело или его фрагмент проявляют одну или несколько из следующих характеристик: (i) содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 130, 162, 234 и 314, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; (ii) содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 138, 170, 186 и 202, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; (iii) содержит домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 136, 168, 240 и 320, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере,

90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; и домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144, 176, 192 и 208, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; (iv) содержит домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 132, 164, 236 и 316, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 134, 166, 238 и 318, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 140, 172, 188 и 204, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; и домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142, 174, 190 и 206, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; (v) представляет собой мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, включающую первую специфичность связывания с PD-1 и вторую специфичность связывания с антигеном, выбранным из группы, состоящей из другого эпитопа PD-1, опухолеспецифического антигена, специфического антигена аутоиммунной ткани, антигена клетки, инфицированной вирусом, различного Т-клеточного соингибитора, Т-клеточного рецептора и Fc рецептора; (vi) связывается с PD-1 человека с $K_D \leq 10^{-9} M$; (vii) связывается с PD-1

обезьяны с $K_D \leq 10^{-8}M$; (viii) блокирует связывание PD-1 с PD-L1 с $IC_{50} \leq 10^{-10}M$; (ix) блокирует PD-1-индуцированную T-клеточную понижающую регуляции и/или спасает сигнальный путь T-клеток в тесте T-клетки/APC люциферазный репортер; (x) стимулирует пролиферацию и активность T-клеток в тесте со смешанной реакцией лимфоцитов (MLR); (xi) индуцирует выработку IL-2 и/или IFN γ в аналитическом тесте MLR; и (xii) подавляет рост опухоли и увеличивает выживаемость у субъектов со злокачественным новообразованием.

Антитела настоящего изобретения могут обладать одной или несколькими из указанных выше биологических характеристик, или любыми их комбинациями. Другие биологические характеристики антител настоящего изобретения будут очевидными для рядового специалиста в данной области из обзора настоящего раскрытия, включающего приведенные в нем рабочие Примеры.

Видовая селективность и видовая кросс-реактивность

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, антитела против PD-1 связываются с PD-1 человека, но не связываются с PD-1 от другого вида. Альтернативно, антитела против PD-1 изобретения, в некоторых вариантах осуществления, связываются с PD-1 человека и с PD-1 от одного или нескольких видов, не являющихся человеком. Например, антитела против PD-1 изобретения могут связываться с PD-1 человека и могут связываться или не связываться, в некоторых случаях, с PD-1 от одного или нескольких из мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, макаки, мартышки, резуса или шимпанзе. В некоторых вариантах осуществления, антитела против PD-1 изобретения могут связываться с PD-1 человека и PD-1 обезьяны с одинаковыми аффинностями или с различными аффинностями, но не связываться с крысиным и мышинным PD-1.

Картирование эпитопов и родственные технологии

Настоящее изобретение включает антитела против PD-1, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами,

обнаруженными внутри одного или нескольких доменов молекулы PD-1, включающих, например, внеклеточный (IgV-подобный) домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, содержащий ингибирующий мотив иммунорецептора (ITIM) и переключающий на основе тирозина мотив иммунорецептора (ITSM). Эпитоп, с которым антитела связываются, может состоять из единичной граничащей последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных внутри любого из указанных выше доменов молекулы PD-1 (например, линейного эпитопа в домене). Альтернативно, эпитоп может состоять из множества неграничащих аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных внутри каждого или обоих из указанных выше доменов молекулы PD-1 (например, конформационного эпитопа).

Различные методы, известные рядовому специалисту в данной области, могут применяться для определения того, "взаимодействует ли антитело с одной или несколькими аминокислотами" внутри полипептида или белка. Иллюстративные методы включают, например, рутинные тесты перекрестного блокирования, такие как описаны в *Antibodies*, Harlow и Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Другие методы включают анализ мутаций при сканировании аланина, блоттинг-анализ пептидов (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), кристаллографические исследования анализа расщепления пептидов и анализ методом ЯМР. В дополнение, могут использоваться методы, такие как иссечение эпитопов, экстракция эпитопов и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). Еще один метод, который может применяться для идентификации аминокислот внутри полипептида, с которым антитело взаимодействует, является обмен водород/дейтерий, обнаруживаемый масс-спектрометрией. В общих чертах, метод обмена водород/дейтерий включает мечение дейтерием белка, представляющего интерес, с последующим связыванием антитела антитело с меченым дейтерием белком. Далее, комплекс белок/антитело переносят в воду и обмениваемые протоны внутри аминокислот, которые защищены комплексом с антителом,

претерпевают обратный обмен дейтерия на водород при более медленной скорости, чем обмениваемые протоны, внутри аминокислот, которые не являются частью поверхности раздела фаз. В результате, аминокислоты, которые образуют часть поверхности раздела фаз белок/антитело, могут удерживать дейтерий и, следовательно, проявляют относительно более высокую массу в сравнении с аминокислотами, не включенными в поверхность раздела фаз. После диссоциации антител, целевой белок подвергают расщеплению протеазой, и проводят масс-спектрометрический анализ, таким образом, отображая меченые дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотами, с которыми антитело взаимодействует. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen и Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

Термин "эпитоп" относится к участку на антигене на который реагируют В- и/или Т-клетки. В-клеточные эпитопы могут быть образованы как из граничащих аминокислот или неграничащих аминокислот, находящиеся рядом посредством третичного складывания белка. Эпитопы, образованные из граничащих аминокислот, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, в то время, как эпитопы, образованные посредством третичного складывания, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает, по меньшей мере, 3, и более обычно, по меньшей мере, 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Профилирование с помощью модификации (MAP), также известное как профилирование антитела на основе структуры антигена (ASAP) представляет собой метод, который категоризирует большое число моноклональных антител (mAb), направленных против одного и того же антигена в соответствии с аналогиями профиля связывания каждого антитела с химически или ферментативно модифицированными поверхностями антигенов (см. US 2004/0101920, специально полностью включенную в данное описание посредством ссылки). Каждая категория может отражать уникальный эпитоп, либо четко отличающийся от эпитопа, представленного

другой одной категорией, или частично перекрывающегося с ним. Эта технология обеспечивает быструю фильтрацию генетически идентичных антител, таким образом, что характеристика может быть сфокусирована на генетически различных антителах. При применении в скрининге гибридом, МАР может способствовать идентификации редких клонов гибридомы, которые продуцируют mAb, имеющие желательные характеристики. МАР может применяться для сортировки антител изобретения в группы антител, связывающих различные эпитопы.

В некоторых вариантах осуществления, антитела против PD-1 или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом внутри любой одной или нескольких из областей, представленных в PD-1, либо в природной форме, как представлено в SEQ ID NO: 327, или полученных рекомбинантно, как представлено в SEQ ID NO: 321-324, или с его фрагментом. В нескольких вариантах осуществления, антитела изобретения связываются с внеклеточной областью, содержащей одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков 21-171 из PD-1. В нескольких вариантах осуществления, антитела изобретения связываются с внеклеточной областью, содержащей одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков 1-146 PD-1 обезьяны, как представлено SEQ ID NO: 322.

В некоторых вариантах осуществления, антитела изобретения, как показано в Таблице 1, взаимодействуют с, по меньшей мере, одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных остатков в интервале от приблизительно положения 21 до приблизительно положения 136 из SEQ ID NO: 327; или аминокислотных остатков в интервале от приблизительно положения 136 до приблизительно положения 171 из SEQ ID NO: 327. Эти области частично представлены в SEQ ID NO: 321-324.

Настоящее изобретение включает антитела против PD-1, которые связываются с одним и тем же эпитопом или частью эпитопа, как любое из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе в Таблице 1, или антитело, имеющее

последовательности CDR любого из иллюстративных антител, описанных в Таблице 1. Аналогично, настоящее изобретение также включает антитела против PD-1, которые конкурируют за связывание с PD-1 или фрагментом PD-1, с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных здесь в Таблице 1, или антителом, имеющим последовательности CDR любого из иллюстративных антител, описанных в Таблице 1. Например, настоящее изобретение включает антитела против PD-1, которые перекрестно конкурируют за связывание с PD-1 с одним или несколькими антителами, определенными в Примере 6 настоящего описания (например, H2aM7788N, H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P и H2aM7795N).

Можно легко определить, связывается ли антитело с одним и тем же эпитопом, или конкурирует за связывание с ним, с эталонным антителом против PD-1, посредством использования рутинных методов, известных в данной области. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с одним и тем же эпитопом, как эталонное антитело против PD-1 изобретения, обеспечивают связывание эталонного антитела с белком или пептидом PD-1 в условиях насыщения. Далее, оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой PD-1. Если тестируемое антитело способно связываться с PD-1 после насыщающего связывания с эталонным антителом против PD-1, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, чем эталонное антитело против PD-1. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с белком PD-1 после насыщающего связывания с эталонным антителом против PD-1, тогда тестируемое антитело может связываться с таким же эпитопом, как эпитоп, связанный эталонным антителом против PD-1 изобретения.

Чтобы определить, конкурирует ли антитело за связывание с эталонным антителом против PD-1, описанную выше методологию связывания осуществляют в двух ориентациях: В первой

ориентации, обеспечивают связывание эталонного антитела с белком PD-1 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой PD-1. Во второй ориентации, обеспечивают связывание тестируемого антитела с молекулой PD-1 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой PD-1. Если в обеих ориентациях, только первое (насыщающее) антитело способно к связыванию с молекулой PD-1, тогда заключают, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с PD-1. Как будет понятно рядовому специалисту в данной области, антитело, конкурирует за связывание с эталонным антителом, не обязательно может связываться с идентичным эпитопом, как эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела посредством связывания перекрывающегося или соседнего эпитопа.

Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждое конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. Таким образом, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого на, по меньшей мере, 50%, но предпочтительно 75%, 90% или даже 99%, измеренное в тесте на конкурентное связывание (см., например, Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 1990 50:1495-1502). Альтернативно, два антитела имеют один и тот же эпитоп, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или исключают связывание одного антитела, уменьшают или исключают связывание другого. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или исключают связывание одного антитела, уменьшают или исключают связывание другого.

Дополнительное рутинное экспериментирование (например, пептидная мутация и анализы связывания) могут затем проводиться для подтверждения того, наблюдается ли недостаток связывания тестируемого антитела фактически вследствие связывания с тем же эпитопом, что и для эталонного антитела, или является ли стерическое блокирование (или еще одно явление) ответственным за недостаток наблюдаемого связывания. Эксперименты этого типа

могут проводиться с использованием ELISA, РИА, поверхностного плазмонного резонанса, поточной цитометрии или любого другого количественного или качественного теста на связывание антитела, доступного в данной области.

Иммуноконъюгаты

Изобретение охватывает человеческое моноклональное антитело против PD-1, конъюгированное с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгатом"), таким как цитотоксин или химиотерапевтическим средством для лечения злокачественного новообразования. Как используют в настоящем описании, термин "иммуноконъюгат" относится к антителу, которое является химически или биологически связанным с цитотоксином, радиоактивным веществом, цитокином, интерфероном, целевым или репортерным фрагментом, ферментом, токсином, пептидом или белком или терапевтическим средством. Антитело может быть связано с цитотоксином, радиоактивным веществом, цитокином, интерфероном, целевым или репортерным фрагментом, ферментом, токсином, пептидом или терапевтическим средством по любому расположению вдоль молекулы, постольку, поскольку оно способно связываться со своей мишенью. Примеры иммуноконъюгатов включают конъюгаты антитела с лекарственным средством и гибридные белки антитело-токсин. В одном варианте осуществления, средство может представлять собой второе отличающееся антитело к PD-1. В некоторых вариантах осуществления, антитело может быть конъюгировано со средством, специфичным для опухолевой клетки или клетки, инфицированной вирусом. Тип терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с антителом против PD-1 и будет выбран с учетом состояния, подлежащего лечению, и желательного терапевтического эффекта, которого необходимо достигнуть. Примеры подходящих средств для образования иммуноконъюгатов известны в данной области; см., например, WO 05/103081.

Мультиспецифические Антитела

Антитела настоящего изобретения могут быть моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут быть специфичными для

различных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные для более, чем одного целевого полипептида. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244.

В одном аспекте, настоящее изобретение включает мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или их антигенсвязывающие фрагменты, где одна специфичность иммуноглобулина является специфичной для внеклеточного домена PD-1, или его фрагмента, а другая специфичность иммуноглобулина является специфичной для связывания с наружным внеклеточным доменом PD-1, или второй терапевтической мишени, или является конъюгированной с терапевтическим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления, первая антигенсвязывающая специфичность может содержать PD-L1 или PD-L2 или их фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения, одна специфичность иммуноглобулина является специфичной для эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 21-171 из PD-1 (SEQ ID NO: 327), или его фрагмента, а другая специфичность иммуноглобулина является специфичной для второго целевого антигена. Второй целевой антиген может находиться на той же клетке, что и PD-1, или на другой клетке. В одном варианте осуществления, вторая целевая клетка является иммунной клеткой, отличающейся от Т-клетки, такой как В-клетка, антигенпрезентирующая клетка, моноцит, макрофаг или дендритная клетка. В нескольких вариантах осуществления, второй целевой антиген может присутствовать на опухолевой клетке или клетке аутоиммунной ткани или на клетке, инфицированной вирусом.

В еще одном другом аспекте, изобретение предоставляет мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие первую антигенсвязывающую специфичность, которая связывается с PD-1, и вторую антигенсвязывающую специфичность, которая связывается с Т-клеточным рецептором, В-клеточным рецептором или Fc рецептором. В родственном аспекте, изобретение предоставляет мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или их

антигенсвязывающие фрагменты, содержащие первую антигенсвязывающую специфичность, которая связывается с PD-1, и вторую антигенсвязывающую специфичность, которая связывается с другим T-клеточным со-ингибитором, таким как LAG-3, CTLA-4, VISTA, CD-28, 2B4, LY108, TIGIT, TIM3, LAIR1, ICOS и CD160.

В еще одном другом аспекте, изобретение предоставляет мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие первую антигенсвязывающую специфичность, которая связывается с PD-1, и вторую антигенсвязывающую специфичность, которая связывается с антигеном, специфичным для аутоиммунной ткани. В некоторых вариантах осуществления, антитела могут являться активирующими или агонистическими антителами.

Любая из мультиспецифических антигенсвязывающих молекул изобретения, или ее варианты, может быть построена с использованием стандартных методов молекулярной биологии (например, технологии рекомбинантной ДНК и экспрессии белка), как известно рядовому специалисту в данной области.

В нескольких вариантах осуществления, PD-1-специфические антитела генерируют в биспецифическом формате ("биспецифические"), в котором переменные области, связывающиеся с различающимися доменами PD-1, связываются вместе для придания двойной доменной специфичности в пределах единственной связывающей молекулы. Соответственно сконструированные биспецифические молекулы могут усиливать общую ингибирующую PD-1 эффективность действия посредством увеличения как специфичности, так и связывающей avidности. Переменные области со специфичностью для индивидуальных доменов, (например, сегментов N-концевого домена), или, которые могут связываться с различными областями внутри одного домена, являются спаренными на структурном каркасе, что позволяет каждой области одновременно связываться с отдельными эпитопами, или с различными областями внутри одного домена. В одном примере биспецифической молекулы, переменные области тяжелой цепи (V_H) из связывающей со специфичностью для одного домена рекомбинируют с переменными областями легкой цепи (V_L)

из ряда связующих со специфичностью для второго домена, чтобы идентифицировать некогнатные партнеры V_L , которые могут быть спарены с исходной V_H без нарушения исходной специфичности для этого V_H . Таким образом, единичный сегмент V_L (например, V_{L1}) может комбинироваться с двумя различными доменами V_H (например, V_{H1} и V_{H2}) для генерации биспецифической молекулы, составленной из двух связывающих "плечей" ($V_{H1}-V_{L1}$ и $V_{H2}-V_{L1}$). Применение единичного сегмента V_L снижает сложность системы и, таким образом, упрощает операции и увеличивает эффективность в процессах клонирования, экспрессии и очистки, применяемых для генерации биспецифической молекулы (см., например, USSN13/022759 и US2010/0331527).

Альтернативно, антитела, которые связываются с несколькими доменами и второй мишенью, такие как, но не ограниченные приведенным, например, второе другое антитело против PD-1, могут быть получены в биспецифическом формате с использованием методов, описанных в данном документе, или других методов, известных квалифицированным специалистам в области. Вариабельные области антитела, связывающиеся с различающимися областями, могут быть связаны вместе с переменными областями, которые связываются с нужными участками, например, на внеклеточном домене PD-1, для придания двойной антигенной специфичности в пределах единственной связывающей молекулы. Соответственно сконструированные биспецифические молекулы такой природы выполняют двойную функцию. Вариабельные области со специфичностью для внеклеточного домена комбинируют с переменной областью со специфичностью для наружного внеклеточного домена и спаривают на структурном каркасе, который обеспечивает связывание каждой переменной области с отдельными антигенами.

Формат иллюстративного биспецифического антитела, которое может применяться в контексте настоящего изобретения, включает применение C_{H3} домена первого иммуноглобулина (Ig) и C_{H3} домена второго Ig, где C_{H3} домены первого и второго Ig отличаются друг от друга, по меньшей мере, одной аминокислотой, и, где, по меньшей мере, одно аминокислотное различие снижает связывание

биспецифического антитела с Белком А в сравнении с биспецифическим антителом, в котором отсутствует аминокислотное различие. В одном варианте осуществления, C_H3 домен первого Ig связывается с Белком А, а C_H3 домен второго Ig содержит мутацию, которая снижает или отменяет связывание с Белком А, такую как модификацию (по нумерации IMGT экзонов; H435R по нумерации EU). Второй C_H3 может дополнительно содержать модификацию (по IMGT; Y436F по EU). Дополнительные модификации, которые могут быть обнаружены внутри второго C_H3, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, и V422I по EU) в случае антитела IgG1; N44S, K52N, и V82I (IMGT; N384S, K392N, и V422I по EU) в случае антитела IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, и V422I по EU) в случае антитела IgG4. Вариации форматов биспецифических антител, описанных выше, рассматриваются, как включенные в пределы объема настоящего изобретения.

Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые могут применяться в контексте настоящего изобретения, включают, без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или диатело, гибриды IgG-scFv, домен с двойной вариабельностью (DVD)-Ig, Квадрому, формат выступы-во-впадины, общую легкую цепь (например, общую легкую цепь с форматом выступы-во-впадины, и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED) тело, лейциновую молнию, Дуотело, IgG1/IgG2, двойного действия Fab (DAF)-IgG, и Mab² биспецифические форматы (см., например, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, и ссылки, цитируемые в ней, для обзора приведенных выше форматов). Биспецифические антитела также могут быть построены с использованием конъюгации пептид/нуклеиновая кислота, например, где неприродные аминокислоты с ортогональной химической реактивностью применяют для генерации сайт-специфичных конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем подвергаются самосборке в мультимерные комплексы с заданным составом, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: Dec. 4, 2012]).

Терапевтическое введение и лекарственные формы

Изобретение предоставляет терапевтические композиции, содержащие антитела против PD-1 настоящего изобретения или их антигенсвязывающие фрагменты. Терапевтические композиции в соответствии с изобретением будут вводиться вместе с подходящими носителями, эксципиентами и другими средствами, которые вводят в лекарственные формы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и т.п. Множество соответствующих лекарственных форм можно найти в справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти лекарственные формы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воска, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как ЛИПОФЕКТИН™), конъюгаты ДНК, безводные поглощающие пасты, эмульсии типа масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакса (полиэтиленгликолей с различной молекулярной массой), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антитела может варьировать в зависимости от возраста и размера субъекта, которому будут вводить, целевого заболевания, состояний, пути введения и т.п. Когда антитело настоящего изобретения применяют для лечения заболевания или расстройства у взрослого пациента или для предотвращения такого заболевания, преимущественным является вводить антитело настоящего изобретения обычно при однократной дозе, равной приблизительно от 0,1 до приблизительно 60 мг/кг массы тела, более предпочтительно, от приблизительно 5 до приблизительно 60, от приблизительно 10 до приблизительно 50, или от приблизительно 20 до приблизительно 50 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния, частоту и продолжительность лечения можно регулировать. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент изобретения могут вводиться в виде начальной дозы, равной, по

меньшей мере, от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 1 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 5 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 10 до приблизительно 200 мг, до приблизительно 100 мг или до приблизительно 50 мг. В некоторых вариантах осуществления, начальная доза может сопровождаться введением второй или множества последующих доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, которое может быть приблизительно таким же или меньшим, чем количество начальной дозы, где последующие дозы разделены по времени на, по меньшей мере, от 1 дня до 3 дней; по меньшей мере, одну неделю, по меньшей мере, 2 недели; по меньшей мере, 3 недели; по меньшей мере, 4 недели; по меньшей мере, 5 недель; по меньшей мере, 6 недель; по меньшей мере, 7 недель; по меньшей мере, 8 недель; по меньшей мере, 9 недель; по меньшей мере, 10 недель; по меньшей мере, 12 недель; или, по меньшей мере, 14 недель.

Различные системы доставки являются известными и могут применяться для введения фармацевтической композиции изобретения, например, инкапсулирование в липисомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные к экспрессии мутантных вирусов, опосредованный рецептором эндоцитоз (см., например, Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Методы введения включают, но не ограничиваются перечисленным, внутрикожный, чрескожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композиция может вводиться посредством любого удобного пути, например, посредством инфузии или болюсной инъекции, посредством всасывания через эпителиальные или слизисто-кожные выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистые оболочки прямой кишки и кишечника и т.д.) и может вводиться вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным. Фармацевтическая композиция также может доставляться в везикуле, в частности, липосоме (см., например, Langer (1990) Science 249:1527-1533).

Применение наночастиц для доставки антитела настоящего

изобретения также предусмотрено в настоящем описании. Конъюгированные с антителом наночастицы могут использоваться как для терапевтических, так и диагностических применений. Конъюгированные с антителом наночастицы и способы получения и применения описаны подробно в Arruebo, M., et al. 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" in J. Nanomat. Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389), включенной в данное описание посредством ссылки. Наночастицы могут быть разработаны и конъюгированы с антителами, содержащимися в фармацевтических композициях, чтобы целенаправленно действовать на опухолевые клетки или клетки аутоиммунных тканей или клетки, инфицированные вирусом. Наночастицы для доставки лекарственного средства также были описаны, например, в US 8257740 или US 8246995, каждая из которых полностью включена в данное описание.

В некоторых ситуациях, фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления, может применяться насос. В еще одном другом варианте осуществления, могут применяться полимерные материалы. В еще одном другом варианте осуществления, система с контролируемым высвобождением может помещаться в близости от мишени для композиции, таким образом, требуя только фракцию системной дозы.

Инъекционные препараты могут включать дозированные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных, внутричерепных, внутрибрюшинных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъекционные препараты могут быть получены общеизвестными методами. Например, инъекционные препараты могут быть получены, например, посредством растворения, суспендирования или эмульгирования антител или их солей, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, традиционно применяемых для инъекций. В качестве водной среды для инъекций, существуют, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т.д., которые могут применяться в

комбинации с соответствующим солюбилизатором, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, НСО-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрированного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды, используют, например, кунжутное масло, соевое масло, и т.д., которые могут применяться в комбинации с солюбилизатором, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Инъекцией, приготовленной, таким образом, предпочтительно заполняют соответствующую ампулу.

Фармацевтическая композиция настоящего изобретения может быть доставлена подкожно или внутривенно с использованием стандартной иглы и шприца. В дополнение, по отношению к подкожной доставке, шприц-ручка для доставки, очевидно, имеет применения при доставке фармацевтической композиции настоящего изобретения. Такая шприц-ручка для доставки может быть многоразовой или одноразовой. В многоразовой шприц-ручке для доставки обычно используют сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Как только вся фармацевтическая композиция в картридже вводится и картридж опустошается, пустой картридж может легко быть утилизирован и заменен на новый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Шприц-ручка для доставки может затем повторно использоваться. В одноразовой шприц-ручке для доставки сменный картридж отсутствует. Вместо этого, одноразовую шприц-ручку для доставки получают предварительно заполненной фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре в устройстве. Как только резервуар освобождается от фармацевтической композиции, целое устройство утилизируют.

Многочисленные устройства для доставки в виде ручки и автоинжектора доставки находят применение при подкожной доставке фармацевтической композиции настоящего изобретения. Примеры включают, но, несомненно, не ограничиваются перечисленными, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf,

Switzerland), ручки HUMALOG MIX 75/25™, ручки HUMALOG™, ручки HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), ручки BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), причем приведено только несколько примеров. Примеры одноразовых шприц-ручек для доставки, имеющих применения при подкожной доставке фармацевтической композиции настоящего изобретения включают, но, несомненно, не ограничиваются перечисленными, ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), причем приведено только несколько примеров.

Преимущественно, фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, получают в виде дозированных форм в однократной дозе, подходящей для обеспечения дозы активных ингредиентов. Такие дозированные формы в стандартной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося антитела обычно составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на дозированную форму в однократной дозе; особенно в форме инъекции, предпочтительно, чтобы антитело содержалось в количестве от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг для других дозированных форм.

Терапевтические применения антител

Антитела изобретения являются применимыми, среди прочего, для лечения, предотвращения и/или уменьшения тяжести любого заболевания или расстройства, ассоциированного с или опосредованного экспрессией, сигнальным путем или активностью PD-1, или вылечиваемого посредством блокирования взаимодействия между PD-1 и лигандом PD-1 (например, PD-L1 или PD-L2) или

иного ингибирования активности и/или сигнального пути PD-1. Например, настоящее изобретение предоставляет способы лечения злокачественного новообразования (ингибирования роста опухоли), хронических вирусных инфекций и/или аутоиммунного заболевания посредством введения антитела против PD-1 (или фармацевтической композиции, содержащей антитело против PD-1), описанных в настоящем документе, пациенту, нуждающемуся в таком лечении. Антитела настоящего изобретения являются применимыми для лечения, предотвращения и/или уменьшения тяжести заболевания или расстройства или состояния, такого как злокачественное новообразование, аутоиммунное заболевание или вирусная инфекция, и/или для уменьшения, по меньшей мере, одного симптома, ассоциированного с таким заболеванием, расстройством или состоянием. В контексте способов лечения, описанных в данном документе, антитело против PD-1 может вводиться в виде монотерапии (т.е., только как терапевтическое средство) или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами (примеры которых описаны в различных разделах настоящего описания).

В нескольких вариантах осуществления изобретения, антитела, описанные в настоящем документе, являются применимыми для лечения субъектов, страдающих от первичного или рецидивирующего злокачественного новообразования, включающего, но не ограниченного приведенными, почечно-клеточную карциному, рак ободочной и прямой кишки, немелкоклеточный рак легких, рак мозга (например, мультиформную глиобластому), плоскоклеточный рак области головы и шеи, рак желудка, рак простаты, рак яичника, рак почки, рак молочной железы, множественную миелому и меланому.

Антитела могут применяться для лечения симптомов на ранней стадии или поздней стадии злокачественного новообразования. В одном варианте осуществления, антитело изобретения или его фрагмент могут применяться для лечения метастазирующего злокачественного новообразования. Антитела являются применимыми при снижении или ингибировании или уменьшения роста опухоли как для солидных опухолей, так и гематологических злокачественных

новообразований. В некоторых вариантах осуществления, лечение антителом изобретения или его антигенсвязывающим фрагментом приводит к более чем 50% регрессии, более чем 60% регрессии, более чем 70% регрессии, более чем 80% регрессии или более чем 90% регрессии опухоли у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, антитела могут применяться для предотвращения рецидив опухоли. В некоторых вариантах осуществления, антитела являются применимыми для увеличения общей выживаемости у субъекта со злокачественным новообразованием. В нескольких вариантах осуществления, антитела являются применимыми при снижении токсичности вследствие химиотерапии или лучевой терапии, в то время, поддерживая долговременную выживаемость у пациента, страдающего от злокачественного новообразования.

В некоторых вариантах осуществления, антитела изобретения являются применимыми для лечения субъектов, страдающих от хронической вирусной инфекции. В нескольких вариантах осуществления, антитела изобретения являются применимыми при снижении концентраций вирусов у хозяина и/или спасения истощенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, антитело изобретения или его фрагмент могут применяться для лечения хронической вирусной инфекции, вызываемой вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV). В нескольких вариантах осуществления, антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент могут вводиться в терапевтической дозе пациенту, инфицированному вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) или вирусом папилломы человека (HPV) или вирусом гепатита В/С (HBV/HCV). В близком варианте осуществления, антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент могут применяться для лечения инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита обезьяны (SIV) у обезьяны-субъекта, такого как макака.

В некоторых вариантах осуществления, блокирующее антитело настоящего изобретения может вводиться в терапевтически эффективном количестве субъекту, страдающему от злокачественного новообразования или вирусной инфекции.

В некоторых вариантах осуществления, антитела изобретения

являются применимыми для лечения аутоиммунного заболевания, включающего, но не ограниченного приведенными, очаговую алопецию, аутоиммунный гепатит, целиакию, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, гемолитическую анемию, воспалительное заболевание кишечника, воспалительные миопатии, рассеянный склероз, первичный билиарный цирроз, псориаз, ревматоидный артрит, склеродерму, синдром Сегрена, системную красную волчанку, витилиго, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунную крапивницу, аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру, болезнь Крона, диабет типа I, эозинофильный фасцит, эозинофильный энтерогастрит, синдром Гудпасчера, тяжелую миастению, псориазический артрит, ревматическую лихорадку, язвенный колит, васкулит и гранулематоз Вегенера. В некоторых вариантах осуществления, активирующее антитело изобретения может применяться для лечения субъекта, страдающего от аутоиммунного заболевания.

Одно или несколько антител настоящего изобретения могут вводиться для ослабления или предотвращения или снижения тяжести одного или более симптомов или состояний заболевания или расстройства.

В данном описании также предусмотрено профилактическое применение одного или нескольких антител настоящего изобретения для пациентов, имеющих риск развития заболевания или расстройства, такого как злокачественное новообразование, аутоиммунное заболевание и хроническая вирусная инфекция.

В дополнительном варианте осуществления изобретения настоящие антитела применяют для получения препарата фармацевтической композиции для лечения пациентов, страдающих от злокачественного новообразования, аутоиммунного заболевания или вирусной инфекции. В еще одном другом варианте осуществления изобретения, настоящие антитела применяют в качестве вспомогательной терапии вместе с любым другим средством или любой другой терапией, известной квалифицированным специалистам в области, применимой для лечения злокачественного новообразования, аутоиммунного заболевания или вирусной инфекции.

Комбинированные терапии и лекарственные формы

Комбинированные терапии могут включать антитело против PD-1 изобретения и любое дополнительное терапевтическое средство, которые могут преимущественно комбинироваться с антителом изобретения, или с биологически активным фрагментом антитела изобретения.

Антитела настоящего изобретения могут комбинироваться синергетически с одним или несколькими противоопухолевыми средствами или терапией, применяемой для лечения злокачественного новообразования, включающего, например, почечно-клеточную карциному, рак ободочной и прямой кишки, мультиформную глиобластому, плоскоклеточный рак области головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак толстой кишки, рак яичника, аденокарциному, рак простаты, глиому и меланому. В настоящем изобретении предусмотрено применение антител против PD-1 изобретения в комбинации с иммуностимулирующими и/или иммуноподдерживающими терапиями, чтобы ингибировать рост опухоли, и/или увеличить выживаемость пациентов со злокачественным новообразованием. Иммуностимулирующие терапии включают прямые иммуностимулирующие терапии для усиления активности иммунных клеток посредством либо "растормаживания" подавленных иммунных клеток или "нажима", чтобы активировать иммунный ответ. Примеры включают целенаправленное действие на другие контрольные рецепторы, вакцинацию и адъюванты. Иммуноподдерживающие модальности могут увеличить антигенность опухоли посредством инициации смерти иммуногенных клеток, воспаления или иметь другие опосредованные эффекты, которые инициируют противоопухолевый иммунный ответ. Примеры включают излучение, химиотерапию, антиагиогенные средства и хирургическое вмешательство.

В различных вариантах осуществления, одно или несколько антител настоящего изобретения могут применяться в комбинации с антителом к PD-L1, вторым антителом к PD-1 (например, ниволумаб), ингибитором LAG-3, ингибитором CTLA-4 (например, ипилимумаб), ингибитором TIM3, ингибитором BTLA, ингибитором TIGIT, ингибитором CD47, антагонистом еще одного T-клеточного

со-ингибитора или лиганда (например, антителом к CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитором индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагонистом фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) [например, "VEGF-Ловушкой", такой как афлиберцепт или другим VEGF-ингибирующим гибридным белком, приведенным в US 7,087,411, или антителом против VEGF или антигенсвязывающим фрагментом (например, бевацизумаб, или ранибизумаб) или низкомолекулярным ингибитором киназы рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)], Ang2 ингибитор (например, несвакумаб), ингибитором трансформирующего ростового фактора бета ($TGF\beta$), ингибитором рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, эрлотиниб, цетуксимаб), агонистом состимулирующего рецептора (например, агонистом глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка), антителом к опухолеспецифичному антигену (например, CA9, CA125, ассоциированному с меланомой антигену 3 (MAGE3), карциноэмбриональным антигеном (CEA), виментином, опухоль-M2-RK, простат-специфическим антигеном (PSA), муцином-1, MART-1, и CA19-9), вакциной (например, бациллой Кальмета-Герена, противораковой вакциной), адъювантом для увеличения презентации антигена (например, гранулоцитарным-макрофагальным колониестимулирующим фактором), биспецифическим антителом (например, биспецифическим антителом CD3xCD20, биспецифическим антителом PSMAXCD3), цитотоксином, химиотерапевтическим средством (например, дакарбазином, темозоломид, циклофосфамидом, доцетакселом, доксорубицином, даунорубицином, цисплатином, карбоплатином, гемцитабином, метотрексатом, митоксантроном, оксалиплатином, паклитакселом и винкристином), циклофосфамидом, лучевой терапией, ингибитором IL-6R (например, сарилумаб), ингибитором IL-4R (например, дупилумаб), ингибитором IL-10, цитокином, таким как IL-2, IL-7, IL-21 и IL-15, конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC) (например, против-CD19-DM4 ADC, и против-DS6-DM4 ADC), противовоспалительным лекарственным средством (например, кортикостероидами, и нестероидными противовоспалительными лекарственными средствами), пищевой добавкой, такой, как

антиоксиданты или любым паллиативным средством для лечения злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления, антитела против PD-1 настоящего изобретения могут применяться в комбинации с противораковыми вакцинами, включающими вакцины против дендритных клеток, онколитические вирусы, вакцины опухолевых клеток и т.д. для усиления протвоопухолевого ответа. Примеры противораковых вакцин, которые могут применяться в комбинации с антителами против PD-1 настоящего изобретения, включают вакцину MAGE3 против меланомы и рака мочевого пузыря, вакцину MUC1 против рака молочной железы, EGFRv3 (например, Риндопепимут) против рака мозга (включая мультиформную глиобластому), или LVAC-CEA (против CEA+раков).

В некоторых вариантах осуществления, антитела против PD-1 изобретения могут вводиться в комбинации с лучевой терапией в способах для генерации долговременных продолжительных протвоопухолевых ответов и/или увеличения выживаемости пациентов со злокачественным новообразованием. В нескольких вариантах осуществления, антитела против PD-1 изобретения могут вводиться до введения, одновременно с введением или после введения лучевой терапии пациенту со злокачественным новообразованием. Например, лучевая терапия может вводиться в одной или нескольких дозах в опухолевые повреждения с последующим введением одной или нескольких доз антитела против PD-1 изобретения. В нескольких вариантах осуществления, лучевая терапия может вводиться местно опухолевое повреждение для увеличения местной иммуногенности опухоли пациента (адъювантное излучение) и/или для уничтожения опухолевых клеток (аблативное излучение) с последующим системным введением антител против PD-1 изобретения. Например, внутричерепное облучение может вводиться пациенту с раком мозга (например, мультиформной глиобластомой) в комбинации с системным введением антитела против PD-1 изобретения. В некоторых вариантах осуществления, антитела против PD-1 изобретения могут вводиться в комбинации с лучевой терапией и химиотерапевтическим средством (например, темозоломидом) или антагонистом VEGF (например, афлиберцептом).

В некоторых вариантах осуществления, антитела против PD-1 изобретения могут вводиться в комбинации с одним или несколькими противовирусными лекарственными средствами для лечения хронических вирусных инфекций, вызываемых LCMV, ВИЧ, HPV, HBV или HCV. Примеры противовирусных лекарственных средств включают, но не ограничиваются перечисленным, зидовудин, ламивудин, абакавир, рибавирин, лопинавир, эфавиренц, кобицистат, тенофовир, рилпивирин и кортикостероиды. В нескольких вариантах осуществления, антитела против PD-1 изобретения могут вводиться в комбинации с ингибитором LAG3, ингибитором CTLA-4 или любым антагонистом еще одного другого T-клеточного со-ингибитора для лечения хронической вирусной инфекции.

В некоторых вариантах осуществления, антитела против PD-1 изобретения могут комбинироваться с антителом к Fc рецептору на иммунных клетках для лечения аутоиммунного заболевания. В одном варианте осуществления, антитело изобретения или его фрагмент вводят в комбинации с антителом или антигенсвязывающим белком, нацеленными на антиген, специфичный к аутоиммунной ткани. В некоторых вариантах осуществления, антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с антителом или антигенсвязывающим белком, целенаправленно действующими на T-клеточный рецептор или B-клеточный рецептор, включающие, но не ограниченные приведенными, Fc α (например, CD89), Fc γ (например, CD64, CD32, CD16a и CD16b), CD19 и т.д. Антитела изобретения или их фрагменты могут применяться в комбинации с любым лекарственным средством или терапией, известными в данной области (например, кортикостероидами и другими иммуносупрессорами) для лечения аутоиммунного заболевания или расстройства, включающего, но не ограниченного перечисленными, очаговую алопецию, аутоиммунный гепатит, целиакию, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, гемолитическую анемию, воспалительное заболевание кишечника, воспалительные миопатии, рассеянный склероз, первичный билиарный цирроз, псориаз, ревматоидный артрит, склеродерму, синдром Сегрена, системную красную волчанку, витилиго,

аутоиммунный панкреатит, аутоиммунную крапивницу, аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру, болезнь Крона, диабет типа I, эозинофильный фасциит, эозинофильный энтергастрит, синдром Гудпасчера, тяжелую миастению, псориазический артрит, ревматическую лихорадку, язвенный колит, васкулит и гранулематоз Вегенера.

Дополнительные терапевтически активные средство (средства)/компонент (компоненты) могут вводиться перед введением, одновременно с введением или после введения антитела против PD-1 настоящего изобретения. Для целей настоящего раскрытия, такие режимы введения рассматривают как введение антитела против PD-1 "в комбинации со" вторым терапевтически активным компонентом.

Дополнительные терапевтически активные компонент (компоненты) могут вводиться субъекту перед введением антитела против PD-1 настоящего изобретения. Например, первый компонент может считаться вводимым "перед" вторым компонентом, если первый компонент вводят за 1 неделю до, 72 часа до, 60 часов до, 48 часов до, 36 часов до, 24 часа до, 12 часов до, 6 часов до, 5 часов до, 4 часа до, 3 часа до, 2 часа до, 1 час до, 30 минут до, 15 минут до, 10 минут до, 5 минут до, или менее, чем за 1 минуту до введения второго компонента. В других вариантах осуществления, дополнительные терапевтически активные компонент (компоненты) могут вводиться субъекту после введения антитела против PD-1 настоящего изобретения. Например, первый компонент может считаться вводимым "после" второго компонента, если первый компонент вводят через 1 минуту после, 5 минут после, 10 минут после, 15 минут после, 30 минут после, 1 час после, 2 часа после, 3 часа после, 4 часа после, 5 часов после, 6 часов после, 12 часов после, 24 часов после, 36 часов после, 48 часов после, 60 часов после, 72 часа после введения второго компонента. В еще других вариантах осуществления, дополнительные терапевтически активные компонент (компоненты) могут вводиться субъекту сопутствующе с введением антитела против PD-1 настоящего изобретения. "Сопутствующее" введение, для целей настоящего изобретения, включает, например, введение

антитела против PD-1 и дополнительного терапевтически активного компонента субъекту в разовой дозированной форме (например, совместно составленной), или в отдельных дозированных формах, вводимых субъекту в пределах приблизительно 30 минут или менее друг от друга. Если введение проводят в отдельных дозированных формах, каждая дозированная форма может вводиться через один и тот же путь (например, как антитело против PD-1, так и дополнительный терапевтически активный компонент могут вводиться внутривенно, подкожно, и т.д.); альтернативно, каждая дозированная форма может вводиться различным путем (например, антитело против PD-1 может вводиться внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент может вводиться подкожно). При любом событии, любое введение компонентов в разовой дозированной форме, в отдельных дозированных формах посредством одного и того же пути, или в отдельных дозированных формах посредством различных путей считают "сопутствующим введением" для целей настоящего раскрытия. Для целей настоящего раскрытия, введение антитела против PD-1 "перед введением", "сопутствующе вместе с введением" или "после введения" (как эти термины определены в данном описании выше) дополнительного терапевтически активного компонента рассматривают как введение антитела против PD-1 "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом.

Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антитело против PD-1 настоящего изобретения составляют в лекарственную форму с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентом(компонентами), как описано в любом разделе настоящего описания, используя разнообразные комбинации дозировок.

В иллюстративные варианты осуществления, в которых антитело против PD-1 изобретения вводят в комбинации с антагонистом VEGF (например, VEGF-ловушкой, такой как афлиберцепт), включая введение совместных лекарственных форм, содержащих антитело против PD-1 и антагонист VEGF,

индивидуальные компоненты могут вводиться субъекту и/или совместно быть составлены в лекарственную форму с использованием разнообразных комбинаций дозировок. Например, антитело против PD-1 может вводиться субъекту и/или содержаться в совместной лекарственной форме в количестве, выбранном из группы, состоящей из 0,01 мг, 0,02 мг, 0,03 мг, 0,04 мг, 0,05 мг, 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг, 0,5 мг, 0,6 мг, 0,7 мг, 0,8 мг, 0,9 мг, 1,0 мг, 1,5 мг, 2,0 мг, 2,5 мг, 3,0 мг, 3,5 мг, 4,0 мг, 4,5 мг, 5,0 мг, 6,0 мг, 7,0 мг, 8,0 мг, 9,0 мг и 10,0 мг; и антагонист VEGF (например, VEGF-ловушка такая как афлиберцепт) может вводиться субъекту и/или содержаться в совместной лекарственной форме в количестве, выбранном из группы, состоящей из 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг, 0,5 мг, 0,6 мг, 0,7 мг, 0,8 мг, 0,9 мг, 1,0 мг, 1,1 мг, 1,2 мг, 1,3 мг, 1,4 мг, 1,5 мг, 1,6 мг, 1,7 мг, 1,8 мг, 1,9 мг, 2,0 мг, 2,1 мг, 2,2 мг, 2,3 мг, 2,4 мг, 2,5 мг, 2,6 мг, 2,7 мг, 2,8 мг, 2,9 мг и 3,0 мг. Комбинации/совместные лекарственные формы могут вводиться субъекту в соответствии с любым из режимов введения, раскрытых где-либо еще в настоящем описании, включая, например, дважды в неделю, однократно каждую неделю, однократно каждые 2 недели, однократно каждые 3 недели, однократно каждый месяц, однократно каждые 2 месяца, однократно каждые 3 месяца, однократно каждые 4 месяца, однократно каждые 5 месяцев, однократно каждые 6 месяцев и т.д.

Режимы введения

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, множественные дозы антитела против PD-1 (или фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию антитела против PD-1 и любого из дополнительных терапевтически активных средств, указанных в данном описании) могут вводиться субъекту в течение заданного периода времени. Способы в соответствии с этим аспектом изобретения включают последовательное введение субъекту множества доз антитела против PD-1 изобретения. Как используют в настоящем описании, "последовательное введение" означает, что каждую дозу антитела против PD-1 вводят субъекту в различной временной отметке,

например, в различные дни, разделенные предварительно определенным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее изобретение включает способы, которые включают последовательное введение пациенту однократной начальной дозы антитела против PD-1, с последующими одной или несколькими вторичными дозами антитела против PD-1, и, необязательно, с последующими одной или несколькими третичными дозами антитела против PD-1. Антитело против PD-1 может вводиться при дозе между 0,1 мг/кг и 100 мг/кг.

Термины "начальная доза" "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антитела против PD-1 изобретения. Таким образом, "начальная доза" является дозой, которую вводят в начале режима лечения (также называемой "исходная доза"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Все начальные, вторичные и третичные дозы могут содержать одинаковое количество антитела против PD-1, но обычно могут отличаться друг от друга относительно частоты введения. В некоторых вариантах осуществления, однако, количество антитела против PD-1, содержащееся в начальных, вторичных и/или третичных дозах, варьирует относительно друг друга (например, регулируется с повышением или понижением, по необходимости) в ходе лечения. В некоторых вариантах осуществления, две или несколько доз (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале режима лечения в качестве "нагрузочных доз", сопровождаемые последующими дозами, которые вводят на менее частой основе (например, "поддерживающие дозы").

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения, каждую вторичную и/или третичную дозу вводят в течение от 1 до 26 (например, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза", как

используют в настоящем описании, означает, что в последовательности множества введений, дозу антитела против PD-1, которую вводят пациенту перед введением следующей же дозы в последовательности без каких-либо промежуточных доз.

Способы в соответствии с этим аспектом изобретения могут включать введение пациенту любого числа вторичных и/или третичных доз антитела против PD-1. Например, в некоторых вариантах осуществления, пациенту вводят только однократную вторичную дозу. В других вариантах осуществления, пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогично, в некоторых вариантах осуществления, пациенту вводят только единственную третичную дозу. В других вариантах осуществления, пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

В вариантах осуществления, включающих множество вторичных доз, каждую вторичную дозу могут вводить с такой же частотой, как для других вторичных доз. Например, каждая вторичная доза может вводиться пациенту через 1-2 недели или 1-2 месяца после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления, включающих множество третичных доз, каждая третичная доза может вводиться с той же частотой, как и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться пациенту через 2-12 недель после непосредственно предшествующей дозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, может варьировать в течение прохождения режима лечения. Частота введения может также регулироваться в ходе лечения терапевтом в зависимости от потребностей индивидуального пациента после клинического обследования.

Настоящее изобретение включает введение режимов, при которых от 2 до 6 нагрузочных доз вводят пациенту при первой частоте (например, однократно в неделю, однократно каждые две недели, однократно каждые три недели, однократно в месяц, однократно каждые два месяца и т.д.), с последующим введением двух или более поддерживающих доз пациенту на менее частой основе. Например, в соответствии с этим аспектом изобретения,

если нагрузочные дозы вводят при частоте, равной, *например*, один раз в месяц (например, две, три, четыре или более нагрузочных доз, вводимых один раз в месяц), тогда поддерживающие дозы могут вводиться пациенту однократно каждые пять недель, однократно каждые шесть недель, однократно каждые семь недель, однократно каждые восемь недель, однократно каждые десять недель, однократно каждые двенадцать недель и т.д.).

Диагностические применения антител

Антитела против PD-1 настоящего изобретения могут применяться для обнаружения и/или измерения PD-1 в образце, *например*, для целей диагностики. Несколько вариантов осуществления предусматривают применение одного или нескольких антител настоящего изобретения в аналитических тестах для обнаружения заболевания или расстройства, такого как злокачественное новообразование, аутоиммунное заболевание или хроническая вирусная инфекция. Иллюстративные диагностические аналитические тесты для PD-1 могут включать в себя, *например*, контактирование образца, полученного от пациента, с антителом против PD-1 изобретения, где антитело против PD-1 является меченым обнаруживаемой меткой или репортерной молекулой или применяется в качестве иммобилизованного лиганда для селективного выделения PD-1 из образцов пациента. Альтернативно, немеченое антитело против PD-1 может применяться в диагностических приложениях в комбинации с вторичным антителом, которое само является обнаруживаемым меченым. Обнаруживаемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоактивный изотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как изотиоцианат флуоресцеина или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Специфичные иллюстративные аналитические тесты, которые могут применяться для обнаружения или измерения PD-1 в образце, включают фермент-связанный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (РИА) и сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

Образцы, которые могут применяться в диагностических аналитических тестах на PD-1 в соответствии с настоящим изобретением, включают любой образец ткани или жидкой среды, получаемый от пациента, который содержит обнаруживаемые количества либо белка PD-1 или его фрагментов при нормальных или патологических состояниях. Обычно, уровни PD-1 в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не пораженного злокачественным новообразованием или аутоиммунным заболеванием), будут измеряться, чтобы первоначально установить исходный или стандартный уровень PD-1. Этот исходный уровень PD-1 может затем сравниваться с уровнями PD-1, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов, с подозрением на состояние, относящееся к злокачественному новообразованию, или симптомами, ассоциированными с таким состоянием.

Антитела, специфичные к PD-1, могут не содержать дополнительных меток или фрагментов или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или фрагмент. В одном варианте осуществления, метка или фрагмент представляет собой биотин. В аналитическом тесте на связывание, расположение метки (при ее наличии) может определять ориентацию пептида относительно поверхности, с которой пептид связан. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий N-концевую биотин, будет ориентирован таким образом, что C-концевая часть пептида будет удалена от поверхности.

[0194] Аспекты изобретения относятся к применению раскрытых антител в качестве маркеров для предсказательного прогнозирования злокачественного новообразования или аутоиммунного расстройства у пациентов. Антитела настоящего изобретения могут применяться в диагностических аналитических тестах для оценки прогнозирования злокачественного новообразования у пациента и для предсказания выживаемости.

ПРИМЕРЫ

[0195] Следующие примеры предлагаются, чтобы, таким образом, предоставить рядовым специалистам в области полное раскрытие и описание того, как осуществить и применить способы

и композиции изобретения, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения считают их изобретения. Были сделаны попытки обеспечить точность по отношению к применяемым числовым значениям (например, количество, температуры и т.д.), но следует принимать во внимание некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иначе, части представляют собой массовые части, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приводится в градусах по шкале Цельсия, комнатная температура равна приблизительно 25°C, и давление является атмосферным или близким к атмосферному.

Пример 1: Генерация человеческих антител к PD-1

[0196] Человеческие антитела к PD-1 генерировали, используя фрагмент PD-1, который находится в приблизительном приблизительном интервале аминокислот 25-170 из последовательности GenBank с учетным номером NP_005009,2 (SEQ ID NO: 327) с изменением C93S. Иммуноген вводили непосредственно, с адъювантом, чтобы стимулировать иммунный ответ, мышам VELOCIMMUNE®, содержащим ДНК, кодирующую тяжелую цепь и каппа область вариабельной области легкой цепи человеческого иммуноглобулина. Иммунный ответ антителами регистрировали посредством PD-1-специфичного иммунологического анализа. Когда достигали желательного иммунного ответа, спленциты собирали и гибридизировали с клетками мышинной миеломы, чтобы сохранить их жизнеспособность и образовать клеточные линии гибридомы. Клеточные линии гибридомы подвергали скринингу и отбирали, чтобы идентифицировать клеточные линии, которые продуцируют PD-1-специфичные антитела. С использованием данного метода и иммуногена, описанного выше, были получены несколько химерных антител против PD-1 (т.е., антител, обладающих человеческими вариабельными доменами и мышинными константными доменами); иллюстративные антитела, генерируемые таким образом, были обозначены как H1M7789N, H1M7799N, H1M7800N, H2M7780N, H2M7788N, H2M7790N, H2M7791N, H2M7794N, H2M7795N, H2M7796N, и H2M7798N.

[0197] Антитела против PD-1 также изолировали непосредственно из антигенположительных В-клеток без гибридизации с клетками миеломы, как описано в U.S. 2007/0280945A1, полностью специально включенной в данное описание посредством ссылки. С использованием этого метода получили несколько полностью человеческих антител против PD-1 (т.е., антител, обладающих человеческими переменными доменами и человеческими константными доменами); иллюстративные антитела, генерируемые таким образом, были обозначены следующим образом: H4N9019P, H4xH9034P2, H4xH9035P2, H4xH9037P2, H4xH9045P2, H4xH9048P2, H4N9057P2, H4N9068P2, H4xH9119P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4xH9135P2, H4xH9145P2, H4xH8992P, H4xH8999P, и H4xH9008P.

[0198] Биологические свойства иллюстративных антител, генерируемых в соответствии с методами данного Примера, описаны подробно в Примерах, приведенных ниже.

Пример 2: Аминокислотные и нуклеотидные последовательности тяжелой цепи и переменной области легкой цепи

[0199] В таблице 1 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи и CDR выбранных антител против PD-1 изобретения. Идентификаторы соответствующих последовательностей нуклеиновых кислот приведены в Таблице 2.

Таблица 1

Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M7789N	2	4	6	8	10	12	14	16
H1M7799N	18	20	22	24	26	28	30	32
H1M7800N	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M7780N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M7788N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M7790N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M7791N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M7794N	114	116	118	120	122	124	126	128
H2M7795N	130	132	134	136	138	140	142	144

H2M7796N	146	148	150	152	154	156	158	160
H2M7798N	162	164	166	168	170	172	174	176
H4H9019P	178	180	182	184	186	188	190	192
H4xH9034P2	194	196	198	200	202	204	206	208
H4xH9035P2	210	212	214	216	202	204	206	208
H4xH9037P2	218	220	222	224	202	204	206	208
H4xH9045P2	226	228	230	232	202	204	206	208
H4xH9048P2	234	236	238	240	202	204	206	208
H4H9057P2	242	244	246	248	202	204	206	208
H4H9068P2	250	252	254	256	202	204	206	208
H4xH9119P2	258	260	262	264	202	204	206	208
H4xH9120P2	266	268	270	272	202	204	206	208
H4xH9128P2	274	276	278	280	202	204	206	208
H4xH9135P2	282	284	286	288	202	204	206	208
H4xH9145P2	290	292	294	296	202	204	206	208
H4xH8992P	298	300	302	304	186	188	190	192
H4xH8999P	306	308	310	312	186	188	190	192
H4xH9008P	314	316	318	320	186	188	190	192

Таблица 2

Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M7789N	1	3	5	7	9	11	13	15
H1M7799N	17	19	21	23	25	27	29	31
H1M7800N	33	35	37	39	41	43	45	47
H2M7780N	49	51	53	55	57	59	61	63
H2M7788N	65	67	69	71	73	75	77	79
H2M7790N	81	83	85	87	89	91	93	95
H2M7791N	97	99	101	103	105	107	109	111
H2M7794N	113	115	117	119	121	123	125	127
H2M7795N	129	131	133	135	137	139	141	143
H2M7796N	145	147	149	151	153	155	157	159
H2M7798N	161	163	165	167	169	171	173	175
H4H9019P	177	179	181	183	185	187	189	191
H4xH9034P2	193	195	197	199	201	203	205	207
H4xH9035P2	209	211	213	215	201	203	205	207
H4xH9037P2	217	219	221	223	201	203	205	207
H4xH9045P2	225	227	229	231	201	203	205	207
H4xH9048P2	233	235	237	239	201	203	205	207

H4H9057P2	241	243	245	247	201	203	205	207
H4H9068P2	249	251	253	255	201	203	205	207
H4xH9119P2	257	259	261	263	201	203	205	207
H4xH9120P2	265	267	269	271	201	203	205	207
H4xH9128P2	273	275	277	279	201	203	205	207
H4xH9135P2	281	283	285	287	201	203	205	207
H4xH9145P2	289	291	293	295	201	203	205	207
H4xH8992P	297	299	301	303	185	187	189	191
H4xH8999P	305	307	309	311	185	187	189	191
H4xH9008P	313	315	317	319	185	187	189	191

[0200] Антитела типовым образом именуется в данном описании в соответствии со следующей номенклатурой: приставка Fc (например, "H4xH," "H1M," "H2M," и т.д.), с последующим числовым идентификатором (например, "7789," "7799," и т.д., как показано в Таблице 1), с последующим суффиксом "P," "P2," "N" или "B". Таким образом, в соответствии с данной номенклатурой, антитело может именоваться в данном описании, как, например, "H1H7789N," "H1M7799N," "H2M7780N" и т.д. Приставки H4xH, H1M, H2M и H2aM в обозначениях антитела, применяемые в данном описании, указывают на конкретный изотип области Fc антитела. Например, антитело "H4xH" имеет Fc человеческого IgG4 с 2 или более изменениями аминокислот, как раскрыто в US20100331527, антитело "H1M" имеет Fc мышинового IgG1, и антитело "H2M" имеет Fc мышинового IgG2 (изотип а или b) (все переменные области полностью являются человеческими, как обозначено первой 'H' в обозначении антитела). Как будет понятно рядовому специалисту в данной области, антитело, имеющее конкретный изотип Fc, может быть преобразовано в антитело с отличающимся изотипом Fc (например, антитело с Fc мышинового IgG1 может быть преобразовано в антитело с человеческим IgG4 и т.д.), но при любом событии, переменные домены (включающие CDR) - которые указаны посредством числовых идентификаторов, показанных в Таблице 1 - будут оставаться такими же, и ожидается, что свойства связывания с антигеном будут идентичными или по существу аналогичными, независимо от природы домена Fc.

[0201] В некоторых вариантах осуществления, выбранные антитела с Fc мышинового IgG1 были преобразованы в антитела с Fc

человеческого IgG4. В одном варианте осуществления, домен Fc IgG4 содержит мутацию серина в пролин в шарнирной области (S108P) для инициации стабилизации димера. В Таблице 3 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи выбранных антител против PD-1 с Fc человеческого IgG4.

Таблица 3

Обозначение антитела	SEQ ID NO:	
	Тяжелая цепь	Легкая цепь
H4H7798N	330	331
H4H7795N2	332	333
H4H9008P	334	335
H4H9048P2	336	337

[0202] Каждая последовательность тяжелой цепи в Таблице 3 содержала переменную область (V_H или HCVR; содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и константную область (содержащую домены C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}). Каждая последовательность легкой цепи в Таблице 3 содержала переменную область (V_L или LCVR; содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3) и константную область (C_L). SEQ ID NO: 330 содержала HCVR, содержащую аминокислоты 1-117 и константную область, содержащую аминокислоты 118-444. SEQ ID NO: 331 содержала LCVR, содержащую аминокислоты 1-107 и константную область, содержащую аминокислоты 108-214. SEQ ID NO: 332 содержала HCVR, содержащую аминокислоты 1-122 и константную область, содержащую аминокислоты 123-449. SEQ ID NO: 333 содержала LCVR, содержащую аминокислоты 1-107 и константную область, содержащую аминокислоты 108-214. SEQ ID NO: 334 содержала HCVR, содержащую аминокислоты 1-119, и константную область, содержащую аминокислоты 120-446. SEQ ID NO: 335 содержала LCVR, содержащую аминокислоты 1-108 и константную область, содержащую аминокислоты 109-215. SEQ ID NO: 336 содержала HCVR, содержащую аминокислоты 1-121 и константную область, содержащую аминокислоты 122-448. SEQ ID NO: 337 содержала LCVR, содержащую аминокислоты 1-108, и константную область, содержащую аминокислоты 109-215.

Пример 3: Связывание антитела с PD-1, определенное посредством поверхностного плазмонного резонанса

[0203] Константы скорости ассоциации и диссоциации при связывании (k_a и k_d , соответственно), равновесные константы диссоциации и периоды половинной диссоциации (K_D и $t_{1/2}$, соответственно) для связывания антигена с очищенными антителами против PD1 определяли с использованием аналитического биосенсорного теста методом поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени на приборе Biacore 4000 или Biacore T200. Поверхность датчика Biacore дериватизировали либо поликлональными кроличьими против мышинных антителами (GE, # BR-1008-38) или моноклональными мышинными против человеческих Fc антителами (GE, # BR-1008-39) для захвата приблизительно 100-900 RU моноклональных антител против PD-1, экспрессируемых вместе с либо мышинным Fc или человеческим Fc, соответственно. Реагенты на PD-1, тестируемые на связывание с антителами против PD-1, включали рекомбинантный PD-1 человека, экспрессируемый с С-концевой мус-мус-гексагистидиновой меткой (hPD-1-MMH; SEQ ID NO: 321), рекомбинантный PD-1 обезьян-макак, экспрессируемый с С-концевой мус-мус-гексагистидиновой меткой (MfPD-1-MMH; SEQ ID NO: 322), димер рекомбинантного PD-1 человека, экспрессируемый либо с С-концевой Fc меткой мышинового IgG2a (hPD-1-mFc; SEQ ID NO: 323) или с С-концевым Fc человеческого IgG1 (hPD1-hFc; SEQ ID NO: 324), и PD-1 обезьяны с mFc (SEQ ID NO: 329). Различные концентрации реагентов на PD-1 в интервале от 200 нМ до 3,7 нМ инжектировали над поверхностью захвата моноклонального антитела против PD-1 при скорости потока, равной 30 мкл/мин на Biacore 4000 или 50 мкл/мин на Biacore T200. Связывание реагентов на PD-1 с захваченными моноклональными антителами регистрировали в течение 3-5 минут, в то время как их диссоциацию из антител регистрировали в течение 7-10 минут в подвижном буфере HBST (0,01 М HEPES pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% об/об поверхностно-активного вещества P20). Эксперименты проводили при 25°C и 37°C. Кинетические константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли посредством обработки и

аппроксимации данных до модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения Scrubber 2,0с для подбора аппроксимирующей кривой. Равновесные константы диссоциации при связывании (K_D) и периоды половинной диссоциации ($t_{1/2}$) затем вычисляли из кинетических констант скорости как: K_D (М) = k_d/k_a и $t_{1/2}$ (мин) = $[\ln 2 / (60 * k_d)]$. Параметры кинетики связывания для различных моноклональных антител против PD-1, связывающихся с различными реагентами на PD-1 при 25°C и 37°C, сведены в Таблицы 4-11.

Таблица 4

Параметры кинетики связывания моноклональных антител против PD-1, связывающихся с человеческим PD-1-ММН при 25°C.

Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (МИН)
H2aM7780N	9,32E+03	3,59E-04	3,85E-08	32
H2aM7788N	1,97E+04	3,88E-04	1,96E-08	30
H1M7789N	2,53E+04	5,31E-05	2,10E-09	218
H2aM7790N	4,63E+04	8,23E-04	1,78E-08	14
H2aM7791N	3,01E+04	7,06E-04	2,34E-08	16
H2aM7794N	5,50E+04	2,12E-03	3,80E-08	5,4
H2aM7795N	4,91E+04	1,15E-03	2,35E-08	10
H2aM7796N	6,73E+03	1,93E-03	2,86E-07	6,0
H2aM7798N	1,32E+05	3,06E-04	2,31E-09	38
H1M7799N	5,04E+04	1,23E-02	2,44E-07	0,9
H1M7800N	5,88E+04	9,47E-03	1,61E-07	1,2
H4H9019P	2,05E+04	8,08E-04	3,94E-08	14
H4xH9034P	1,02E+05	1,49E-03	1,45E-08	7,8
H4xH9035P	1,03E+05	4,75E-04	4,62E-09	24
H4xH9037P	7,32E+04	7,95E-04	1,09E-08	15
H4xH9045P	5,40E+04	4,03E-03	7,46E-08	2,9
H4xH9048P2	1,37E+05	1,23E-03	8,95E-09	9,4
H4H9057P2	4,60E+04	1,34E-02	2,91E-07	0,9
H4H9068P2	NB*	NB*	NB*	NB*

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

*NB указывает на то, что при экспериментальных условиях, реагент на PD-1 не связывался с захваченным моноклональным антителом против PD-1

Таблица 5

Параметры кинетики связывания моноклональных антител против PD-1, связывающихся с человеческим PD-1-ММН при 37°C.

Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H2aM7780N	2,72E+04	1,52E-03	5,58E-08	7,6
H2aM7788N	2,88E+04	1,49E-03	5,19E-08	7,7
H1M7789N	4,53E+04	2,95E-04	6,52E-09	39
H2aM7790N	6,13E+04	5,20E-03	8,49E-08	2,2
H2aM7791N	4,18E+04	2,24E-03	5,35E-08	5,2
H2aM7794N	1,20E+05	7,92E-03	6,61E-08	1,5
H2aM7795N	6,75E+04	4,58E-03	6,78E-08	2,5
H2aM7796N	1,09E+04	1,65E-02	1,51E-06	0,7
H2aM7798N	1,73E+05	6,56E-04	3,79E-09	18
H1M7799N	7,94E+04	4,25E-02	5,36E-07	0,3
H1M7800N	7,83E+04	3,99E-02	5,10E-07	0,3
H4H9019P	1,20E+04	5,44E-03	4,53E-07	2,1
H4xH9034P	2,79E+05	1,12E-02	4,02E-08	1,0
H4xH9035P	2,98E+05	4,26E-03	1,43E-08	2,7
H4xH9037P	2,26E+05	6,68E-03	2,95E-08	1,7

H4xH9045P	8,04E+04	5,32E-02	6,62E-07	0,2
H4xH9048P2	3,70E+05	8,60E-03	2,32E-08	1,3
H4H9057P2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H9068P2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4xH9119P2	2,40E+05	1,04E-02	4,35E-08	1,1
H4xH9120P2	6,88E+04	7,01E-03	1,02E-07	1,6
H4xH9128P2	1,04E+05	4,36E-03	4,20E-08	2,6
H4xH9135P2	4,18E+05	1,11E-02	2,66E-08	1,0
H4xH9145P2	1,31E+05	1,23E-02	9,40E-08	0,9
H4xH8992P	IC*	IC*	IC*	IC*
H4xH8999P	5,99E+05	9,42E-03	1,57E-08	1,2
H4xH9008P	1,29E+05	8,09E-03	6,26E-08	1,4
H4H7795N2	6,41E+04	6,64E-03	1,04E-07	1,7
H4H7798N	2,27E+05	1,70E-03	7,48E-09	7

*NB указывает на то, что при экспериментальных условиях, реагент на PD-1 не связывался с захваченным моноклональным антителом против PD-1. IC указывает на то, что при экспериментальных условиях, связывание с PD-1 является неокончательным.

Таблица 6

Параметры кинетики связывания моноклональных антител против PD-1, связывающихся с димером человеческого PD-1 (человеческий PD-1-mFc или человеческий PD-1-hFc) при 25°C.

Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H2aM7780N	4,21E+04	9,94E-06	2,36E-10	1162
H2aM7788N	8,94E+04	2,82E-05	3,15E-10	410
H1M7789N	3,91E+04	4,31E-05	1,10E-09	268
H2aM7790N	1,86E+05	3,02E-05	1,62E-10	383
H2aM7791N	4,05E+04	1,01E-04	2,49E-09	114
H2aM7794N	1,79E+05	1,06E-04	5,93E-10	109
H2aM7795N	1,38E+05	3,14E-05	2,27E-10	368
H2aM7796N	2,61E+04	8,67E-05	3,32E-09	133

H2aM7798N	3,50E+05	2,29E-05	6,55E-11	505
H1M7799N	2,38E+05	8,55E-05	3,60E-10	135
H1M7800N	1,52E+05	7,72E-05	5,09E-10	150
H4H9019P	4,38E+04	8,61E-05	1,97E-09	134
H4xH9034P	2,15E+05	1,51E-04	7,01E-10	77
H4xH9035P	2,01E+05	1,03E-04	5,13E-10	112
H4xH9037P	1,50E+05	1,29E-04	8,62E-10	89
H4xH9045P	9,13E+04	1,60E-04	1,75E-09	72
H4xH9048P2	2,36E+05	1,88E-04	7,98E-10	61
H4H9057P2	1,01E+05	1,77E-04	1,75E-09	65
H4H9068P2	4,72E+04	2,80E-03	5,94E-08	4
H4xH9119P2	1,63E+05	1,62E-04	9,92E-10	71
H4xH9120P2	6,52E+04	1,19E-04	1,82E-09	97
H4xH9128P2	8,37E+04	1,33E-04	1,59E-09	87
H4xH9135P2	2,12E+05	1,38E-04	6,51E-10	84
H4xH9145P2	6,58E+04	1,58E-04	2,40E-09	73
H4xH8992P	2,35E+05	1,60E-04	6,80E-10	72
H4xH8999P	5,55E+05	1,20E-04	2,17E-10	96
H4xH9008P	3,52E+04	2,80E-05	7,96E-10	412
H4H7795N2	1,50E+05	9,25E-05	6,15E-10	125
H4H7798N	4,41E+05	5,40E-05	1,22E-10	214

Таблица 7

Параметры кинетики связывания моноклональных антител против PD-1, связывающихся с димером человеческого PD-1 (человеческий PD-1-mFc или человеческий PD-1-hFc) при 37°C.

Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H2aM7780N	9,94E+04	2,29E-05	2,30E-10	505
H2aM7788N	1,31E+05	2,13E-05	1,63E-10	542
H1M7789N	1,09E+05	$\leq 1,0E-05$	$\leq 9,17E-11$	≥ 1155
H2aM7790N	2,01E+05	8,49E-05	4,22E-10	136
H2aM7791N	4,98E+04	1,79E-04	3,59E-09	65
H2aM7794N	4,68E+05	2,11E-04	4,52E-10	55

H2aM7795N	1,65E+05	6,13E-05	3,71E-10	188
H2aM7796N	2,21E+04	4,34E-04	1,96E-08	27
H2aM7798N	4,90E+05	1,40E-05	2,80E-11	825
H1M7799N	4,41E+05	1,81E-04	4,11E-10	64
H1M7800N	4,00E+05	1,81E-04	4,50E-10	64
H4H9019P	7,17E+04	1,95E-04	2,71E-09	59
H4xH9034P	3,02E+05	6,30E-04	2,09E-09	18
H4xH9035P	3,16E+05	5,54E-04	1,75E-09	21
H4xH9037P	2,63E+05	9,21E-04	3,50E-09	13
H4xH9045P	2,14E+05	1,10E-03	5,13E-09	11
H4xH9048P2	3,61E+05	1,10E-03	3,05E-09	10
H4H9057P2	2,33E+05	2,11E-03	9,07E-09	5
H4H9068P2	9,69E+04	1,20E-02	1,24E-07	1
H4xH9119P2	2,40E+05	9,09E-04	3,80E-09	13
H4xH9120P2	8,08E+04	4,82E-04	5,96E-09	24
H4xH9128P2	1,86E+05	6,86E-04	3,68E-09	17
H4xH9135P2	3,10E+05	7,02E-04	2,27E-09	16
H4xH9145P2	1,60E+05	5,71E-04	3,58E-09	20
H4xH8992P	3,49E+05	1,02E-03	2,91E-09	11
H4xH8999P	7,57E+05	4,51E-04	5,96E-10	26
H4xH9008P	5,52E+04	$\leq 1,0E-05$	$\leq 1,81E-10$	≥ 1155
H4H7795N2	1,60E+05	2,64E-04	1,65E-09	44
H4H7798N	6,60E+05	1,15E-04	1,75E-10	100

Таблица 8

Параметры кинетики связывания моноклональных антител против PD-1, связывающихся с MfPD-1-ММН при 25°C.

Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H2aM7780N	1,00E+04	3,15E-04	3,15E-08	37
H2aM7788N	8,63E+03	6,62E-04	7,66E-08	17
H1M7789N	1,55E+04	1,23E-04	7,89E-09	94
H2aM7790N	3,11E+04	9,37E-04	3,01E-08	12
H2aM7791N	1,61E+04	5,53E-04	3,44E-08	21

H2aM7794N	3,60E+04	5,99E-03	1,66E-07	1,9
H2aM7795N	4,44E+04	8,89E-04	2,01E-08	13
H2aM7796N	NB*	NB*	NB*	NB*
H2aM7798N	8,72E+04	3,93E-04	4,50E-09	29
H1M7799N	5,78E+04	1,30E-02	2,24E-07	0,9
H1M7800N	5,89E+04	1,04E-02	1,76E-07	1,1
H4H9019P	1,94E+04	8,33E-04	4,29E-08	14
H4xH9034P	9,61E+04	2,69E-03	2,80E-08	4,3
H4xH9035P	9,36E+04	4,34E-04	4,64E-09	27
H4xH9037P	6,99E+04	9,15E-04	1,31E-08	13
H4xH9045P	6,25E+04	7,05E-03	1,13E-07	1,6
H4xH9048P2	1,28E+05	8,97E-04	7,00E-09	13
H4H9057P2	3,46E+04	1,91E-02	5,51E-07	0,6
H4H9068P2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4xH9119P2	7,50E+04	1,66E-03	2,22E-08	6,9
H4xH9120P2	3,17E+04	1,08E-03	3,41E-08	11
H4xH9128P2	3,68E+04	6,49E-04	1,77E-08	18
H4xH9135P2	1,24E+05	1,31E-03	1,06E-08	8,8
H4xH9145P2	2,86E+04	1,24E-03	4,31E-08	9,3
H4xH8992P	1,88E+05	3,76E-02	2,00E-07	0,3
H4xH8999P	4,29E+05	1,33E-03	3,09E-09	8,7
H4xH9008P	1,05E+05	2,49E-03	2,38E-08	4,6
H4H7795N2	6,59E+04	1,48E-03	2,24E-08	8
H4H7798N	1,43E+05	5,51E-04	3,86E-09	21

*NB указывает на то, что при экспериментальных условиях, реагент на PD-1 не связывался с захваченным моноклональным антителом против PD-1

Таблица 9

Параметры кинетики связывания моноклональных антител против PD-1, связывающихся с MfPD-1-ММН при 37°C.

Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H2aM7780N	2,29E+04	1,38E-03	6,05E-08	8,3

H2aM7788N	1,88E+04	3,28E-03	1,74E-07	3,5
H1M7789N	4,79E+04	4,08E-04	8,50E-09	28
H2aM7790N	2,55E+04	6,93E-03	2,71E-07	1,7
H2aM7791N	3,79E+04	1,91E-03	5,05E-08	6,0
H2aM7794N	6,66E+04	2,01E-02	3,02E-07	0,6
H2aM7795N	6,47E+04	3,89E-03	6,02E-08	3,0
H2aM7796N	NB*	NB*	NB*	NB*
H2aM7798N	1,42E+05	9,93E-04	7,00E-09	12
H1M7799N	8,80E+04	4,67E-02	5,30E-07	0,2
H1M7800N	8,40E+04	4,43E-02	5,27E-07	0,3
H4H9019P	2,14E+04	7,63E-03	3,56E-07	1,5
H4xH9034P	2,83E+05	2,47E-02	8,73E-08	0,5
H4xH9035P	3,06E+05	4,29E-03	1,40E-08	2,7
H4xH9037P	2,22E+05	8,80E-03	3,97E-08	1,3
H4xH9045P	1,40E+04	1,05E-01	7,54E-06	0,1
H4xH9048P2	4,15E+05	6,97E-03	1,68E-08	1,7
H4H9057P2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H9068P2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4xH9119P2	2,40E+05	1,23E-02	5,14E-08	0,9
H4xH9120P2	6,98E+04	7,48E-03	1,07E-07	1,5
H4xH9128P2	9,06E+04	4,18E-03	4,61E-08	2,8
H4xH9135P2	4,62E+05	1,34E-02	2,89E-08	0,9
H4xH9145P2	1,71E+05	1,43E-02	8,37E-08	0,8
H4xH8992P	IC*	IC*	IC*	IC*
H4xH8999P	9,83E+05	9,26E-03	9,41E-09	1,2
H4xH9008P	5,86E+05	1,38E-02	2,35E-08	0,8
H4H7795N2	7,80E+04	6,89E-03	8,83E-08	1,7
H4H7798N	2,13E+05	2,23E-3	1,05E-08	5

*NB указывает на то, что при экспериментальных условиях, реагент на PD-1 не связывался с захваченным моноклональным антителом против PD-1. IC указывает на то, что при экспериментальных условиях, связывание с PD-1 является неокончательным.

Таблица 10

Параметры кинетики связывания моноклональных антител против PD-1, связывающихся с димером PD-1 обезьяны (PD-1-мFc обезьяны) при 25°C

Антитело	Количество захваченного мAb (RU)	100 нМ связанного PD-1-мFc обезьяны (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H9019P	116	31	4,55E+04	8,96E-05	1,97E-09	129
H4xH9034P	215	95	2,03E+05	1,66E-04	8,18E-10	70
H4xH9035P	153	78	2,16E+05	9,96E-05	4,60E-10	116
H4xH9037P	137	58	1,50E+05	1,37E-04	9,12E-10	84
H4xH9045P	202	78	9,78E+04	1,68E-04	1,72E-09	69
H4xH9048P2	227	115	2,43E+05	1,84E-04	7,54E-10	63
H4H9057P2	196	75	1,02E+05	3,03E-04	2,98E-09	38
H4H9068P2	178	17	5,70E+04	3,09E-03	5,42E-08	4
H4xH9119P2	209	83	1,63E+05	1,72E-04	1,05E-09	67
H4xH9120P2	195	52	5,84E+04	1,12E-04	1,91E-09	104
H4xH9128P2	175	64	7,87E+04	1,24E-04	1,57E-09	94
H4xH9135P2	150	74	2,38E+05	1,43E-04	6,02E-10	81
H4xH9145P2	304	84	7,24E+04	1,50E-04	2,08E-09	77
H4xH8992P	260	122	2,03E+05	2,51E-04	1,24E-09	46

H4xH8999P	217	126	5,50E+05	1,15E-04	2,10E-10	100
H4xH9008P	248	93	1,20E+05	5,77E-05	4,80E-10	200
H4H7795N2	204	60	1,60E+05	9,92E-05	6,21E-10	116
H4H7798N	223	93	4,49E+05	6,14E-05	1,37E-10	188

Таблица 11

Параметры кинетики связывания моноклональных антител против PD-1, связывающихся с димером PD-1 обезьяны (PD-1-мFc обезьяны) при 37°C

Антитело	Количество захваченного мAb (RU)	100 нМ связанного PD-1-мFc обезьяны (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H9019P	89	36	8,16E+04	2,59E-04	3,17E-09	45
H4xH9034P	184	81	3,07E+05	7,49E-04	2,44E-09	15
H4xH9035P	88	40	3,67E+05	6,23E-04	1,70E-09	19
H4xH9037P	55	24	2,80E+05	8,97E-04	3,21E-09	13
H4xH9045P	161	65	2,41E+05	1,36E-03	5,66E-09	8
H4xH9048P2	184	84	4,94E+05	1,13E-03	2,29E-09	10
H4H9057P2	105	28	1,61E+05	4,77E-03	2,96E-08	2,4
H4H9068P2	90	6	1,21E+05	1,05E-02	8,63E-08	1,1
H4xH9119P2	98	40	2,79E+05	8,85E-04	3,17E-09	13
H4xH9120P2	141	46	8,29E+04	5,02E-04	6,06E-09	23

H4xH9128P2	148	60	1,87E+05	8,16E-04	4,36E-09	14
H4xH9135P2	106	52	3,42E+05	7,94E-04	2,32E-09	15
H4xH9145P2	284	94	1,51E+05	6,09E-04	4,04E-09	19
H4xH8992P	206	86	3,50E+05	1,53E-03	4,38E-09	8
H4xH8999P	160	83	7,30E+05	5,10E-04	7,00E-10	23
H4xH9008P	216	98	2,04E+05	1,00E-05*	4,90E-11*	1155*
H4H7795N2	164	47	1,70E+05	2,90E-04	1,71E-09	40
H4H7798N	203	88	6,30E+05	1,27E-04	2,02E-10	91

* указывает на то, что при используемых экспериментальных условиях, диссоциации реагент на PD-1 не наблюдали и значение k_d вручную фиксировали при $1,00E-05$

[0204] Как показано в Таблице 4, при 25°C, 28 из 29 антител против PD-1 изобретения связывались с hPD-1-ММН со значениями K_D в интервале от 2,1 нМ до 291 нМ. Одно антитело, H4H9068P2, не демонстрировало какого-либо измеряемого связывания с hPD-1-ММН при 25°C. Как показано в Таблице 5, при 37°C, 26 из 29 антител против PD-1 изобретения связывались с hPD-1-ММН со значениями K_D в интервале от 3,79 нМ до 1,51 мкМ. Три антитела изобретения не демонстрировали какого-либо убедительного связывания с hPD-1-ММН при 37°C. Как показано в Таблице 6, при 25°C, все 29 антител против PD-1 изобретения связывались с белками димера hPD-1 со значениями K_D в интервале от 65,5 пМ до 59,4 нМ. Как показано в Таблице 7, при 37°C, все 27 антител изобретения против PD-1 связывались с белками димера hPD-1 со значениями K_D в интервале от 3,09 пМ до 551 нМ. Как показано в Таблице 8, при 25°C, 27 из 29 антител изобретения против PD-1 связывались с MfPD-1-ММН со значениями K_D в интервале от 3,09 нМ до 551 нМ. Два антитела изобретения не демонстрировали какого-либо убедительного связывания с MfPD-1-ММН при 25°C. Как показано в Таблице 9, при 37°C, 25 из 29 антител изобретения против PD-1 связывались с MfPD-1-ММН со значениями K_D в интервале от 7,00 нМ до 7,54 мкМ. Четыре антитела изобретения не демонстрировали какого-либо убедительного связывания с MfPD-1-ММН при 37°C. Как показано в Таблице 10, при 25°C, все 18 тестированных антител против PD-1 изобретения связывались с димером MfPD-1 со значениями K_D в интервале от 137 пМ до 54,2 нМ. Как показано в Таблице 11, при 37°C, все 18 тестированных антител изобретения против PD-1 связывались с димером MfPD-1 со значениями K_D в интервале от менее, чем 49 пМ до 86,3 нМ.

Пример 4: Блокирование связывание PD-1 с PD-L1, определенное посредством ELISA

[0205] Способность антител против PD-1 блокировать связывание PD-1 человека с его лигандом, PD-L1 рецептором, измеряли, используя три конкурентных формата сэндвич-ELISA.

Димерные человеческие белки PD-L1, состоящие из части внеклеточного домена человеческого PD-L1, экспрессируемого либо с С-концевой меткой человеческого Fc (hPD-L1-hFc; SEQ ID: 325) или С-концевой меткой мышиноного Fc (hPD-L1-mFc; SEQ ID: 326), или димерный человеческий PD-L2, состоящий из внеклеточной области человеческого PD-L2, полученный с С-концевой меткой человеческого Fc (hPD-L2-hFc; R&D Systems, #1224-PL) раздельно вносили при концентрации, равной 2 мкг/мл в PBS в 96-луночный планшет для микротитрования и оставляли в течение ночи при 4°C. Участки неспецифического связывания последовательно блокировали, используя 0,5% (м/об) раствор BSA в PBS. В первом конкурентном формате, постоянную концентрацию, равную 1,5 нМ димерного белка PD-1 человека, содержащего из внеклеточный домен PD-1 человека экспрессируемый с С-концевой меткой мышиноного Fc (hPD-1-mFc; SEQ ID: 323) добавляли к серийным разведениям антител против PD-1 или антител изотипического контроля, таким образом, что конечные концентрации антител находились в интервале от 0 до 200 нМ. Во втором конкурентном формате, постоянную концентрацию, равную 200 пМ димерного биотинированного белка PD-1 человека, содержащего внеклеточный домен PD-1 человека, который экспрессировался с С-концевой меткой человеческого Fc (biot-hPD-1-hFc; SEQ ID: 323), аналогично добавляли к серийным разведениям антител против PD-1 или антител изотипического контроля при конечных концентрациях антител в интервале от 0 до 50нМ. В третьем конкурентном формате, постоянную концентрацию, равную 100 пМ, димерного белка hPD-1-mFc аналогично добавляли к серийным разведениям антител против PD-1 или изотипическим контролям при конечных концентрациях антител в интервале от 0 до 100нМ. Эти комплексы антитело-белок затем инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ). Комплексы антитело-белок с 1,5 нМ константной hPD-1-mFc переносили в планшеты для микротитрования, покрытые hPD-L1-hFc, комплексы антитело-белок с 200 пМ константной biot-hPD-1-hFc переносили в планшеты, покрытые hPD-L1-mFc, и комплексы антитело-белок с 100 пМ

константной hPD-1-mFc переносили в планшеты для микротитрования, покрытые hPD-L2-hFc. После инкубации в течение 1 часа при КТ, лунки промывали, и связанный с планшетом hPD-1-mFc обнаруживали вместе с поликлональным антителом против mFc, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) (Jackson ImmunoResearch Inc., #115-035-164), и связанный с планшетом biot-hPD-1-hFc обнаруживали вместе со стрептавидином, конъюгированным с HRP (Thermo Scientific, #N200). Образцы проявляли раствором ТМВ (BD Biosciences, #51-2606КС и #51-2607КС) для получения колориметрической реакции и затем проявление цвета стабилизировали добавлением 1М серной кислоты перед измерением поглощения при 450 нм на считывающем устройстве для планшетов Victor X5. Анализ данных проводили, используя сигмовидную модель доза-ответ в программном обеспечении Prism™ (GraphPad). Рассчитанное значение IC₅₀, определяемое как концентрация антитела, требуемая для снижения на 50% связывания PD-1 человека с человеческими PD-L1 или PD-L2, применяли как показатель активности блокирования potency. Процент максимальной блокады рассчитывали как меру измерения способности антитела полностью блокировать связывание PD-1 человека с человеческими PD-L1 или PD-L2 на планшете, как определяют по дозовой кривой. Данный процент максимальной блокировки рассчитывали посредством вычитания из 100% отношения снижения сигнала, наблюдаемого в присутствии наивысшей тестируемой концентрации для каждого антитела относительно различия между сигналом, наблюдаемым для образца PD-1 человека, не содержащего антитела против PD-1 (0% блокирования), и фонового сигнала от HRP-конъюгированного вторичного антитела по отдельности (100% блокирования).

[0206] Процентная максимальная блокировка и рассчитанные значения IC₅₀ для блокирования антителом, большего, чем 35% от сигнала связывания hPD-1, показаны в Таблицах 12-14. Антитела, которые показали снижение сигнала связывания hPD-1, равное 35% или менее, определяли как неблокаторы. Антитела, которые показали увеличение, равное 35% или более, сигнала связывания

PD-1 человека, характеризовали как неблокаторы/энхансеры. Теоретический нижний предел теста, определяемый как минимальная концентрация антитела, теоретически необходимая для занятия 50% участков связывания PD-1 человека в тесте, составляет 0,75 нМ для формата с использованием постоянной 1,5 нМ hPD-1-mFc, 100 пМ для формата с использованием постоянной 200 пМ биот-hPD-1-hFc, и 50 пМ для формата с использованием постоянной 100 пМ hPD-1-mFc, указывая на то, что более низкие рассчитанные значения IC₅₀ могут не представлять количественный участок связывания белок-антитело. По этой причине, антитела с рассчитанными значениями IC₅₀, меньшими, чем 0,75 нМ в тесте с постоянным hPD-1-mFc и покрытием hPD-L1, меньшими, чем 100 пМ в тесте с постоянным биот-hPD-1-hFc и покрытием hPD-L1, и меньшими, чем 50 пМ в тесте с постоянным hPD-1-mFc и покрытием hPD-L2 приведены в Таблицах 12 - 14 как <7,5E-10M, <1,0E-10M и <5,0E-11M, соответственно.

Таблица 12

Блокирование связывания PD-1 человека с человеческим PD-L1 под действием антител против PD-1 по результатам ELISA

Антитело	Блокирование связывания 1,5нМ hPD-1-mFc с hPD-L1-hFc, IC ₅₀ (M)	Блокирование связывания 200нМ антитела 1,5нМ hPD-1-mFc с hPD-L1-hFc, % блокирования
H4H9019P	1,3E-09	98
H4xH9034P	5,1E-10*	98
H4xH9045P	2,8E-10*	98
H4xH9048P2	3,3E-09	67
H4xH9120P2	1,0E-09	98
H4xH9128P2	6,4E-10*	98
H4xH9035P	6,2E-10*	99
H4xH9135P2	1,1E-09	97
H4xH9145P2	9,3E-10	90
H4xH9119P2	2,0E-10*	78

H4H9057P2	1,9E-10*	98
H4H9068P2	NB1/ Энхансер	-142
H4xH9037P	8,9E-10	100
H2aM7780N	6,9E-10*	94
H2aM7788N	2,2E-10*	74
H1M7789N	NB1/ Энхансер	-170
H2aM7790N	1,5E-09	74
H2aM7791N	NB1/ Энхансер	-154
H2aM7794N	1,1E-09	95
H2aM7795N2	8,6E-10	93
H2aM7796N	NB1	-20
H2aM7798N	6,8E-10*	93
H1M7799N	2,2E-10*	82
H1M7800N	6,0E-10*	83
H4xH8992P	1,3E-09	93
H4xH8999P	1,3E-09	88
H4xH9008P	2,4E-09	88
Изотипический контроль 1	NB1	-3
Изотипический контроль 2	NB1	-34
Изотипический контроль 2	NB1	-7
Изотипический контроль 2	NB1	-16

Теоретический нижний предел теста: для блокирования ELISA с постоянным hPD-1-mFc и покрытием hPD-L1 составляет $7,5E-10$ М

(*) - Ниже теоретического нижнего предела теста;

NT- не тестировали; NB1 - неблокатор;

NB1/Энхансер - неблокатор/энхансер; IC - неубедительный

Таблица 13

Блокирование связывания биотинилированного PD-1 человека с человеческим PD-L1 антителами против PD-1 по данным ELISA

Антитело	Блокированы 200 пМ связывания биот-hPD-1-hFc с hPD-L1-mFc, IC ₅₀ (М)	Блокирование 50 нМ антитела связывания 200рМ биот-hPD-1-hFc с hPD-L1-mFc, % блокирования
H4H9019P	6,4E-10	97
H4xH9034P	6,6E-11*	96
H4xH9045P	1,3E-10	95
H4xH9048P2	IC	76
H4xH9120P2	3,9E-10	96
H4xH9128P2	1,9E-10	97
H4xH9035P	8,0E-11*	95
H4xH9135P2	1,5E-10	96
H4xH9145P2	3,5E-10	97
H4xH9119P2	8,2E-11*	96
H4H9057P2	NB1/Энхансер	-57
H4H9068P2	NB1/Энхансер	-43
H4xH9037P	7,8E-11*	95
H2aM7780N	9,1E-11*	100
H2aM7788N	6,5E-11*	100
H1M7789N	NB1	9
H2aM7790N	1,9E-10	99
H2aM7791N	NB1/Энхансер	-45
H2aM7794N	2,3E-10	99
H2aM7795N2	6,9E-11*	99
H2aM7796N	1,3E-09	60
H2aM7798N	7,3E-11*	100
H1M7799N	5,9E-11*	100
H1M7800N	6,5E-11*	99
H4xH8992P	1,6E-10	97

H4xH8999P	1,8E-10	92
H4xH9008P	1,3E-09	93
Изотипический контроль 1	NB1	19
Изотипический контроль 2	NB1	35
Изотипический контроль 2	NB1	-18
Изотипический контроль 2	NB1	-11

Теоретическое нижний предел теста: для блокирования по данным ELISA с постоянным биот-hPD-1-mFc и покрытием hPD-L1 составляет 1,0E-10 M

(*) - Ниже теоретического нижнего предела теста;

NT- не тестированный; NB1 - неблокатор;

NB1/Энхансер - неблокатор/энхансер; IC - неокончательный

Таблица 14

Блокирование связывания PD-1 человека с человеческим PD-L2 антителами против PD-1 по данным ELISA

Антитело	Блокирование 100 пМ связывания hPD-1-mFc с hPD-L2-hFc, IC ₅₀ (M)	Блокирование 100 нМ антитела связывания 100 пМ hPD-1-mFc с hPD-L2-hFc, % блокирования
H4xH9048P2	1,4E-10	98
H2aM7795N2	2,6E-10	100
H2aM7798N	1,3E-10	100
H4xH9008P	1,3E-09	94
Изотипический контроль 2	NB1	-27

Теоретический нижний предел теста: блокирование ELISA с использованием постоянного hPD-1-mFc и покрытия hPD-L2 составляет 5,0E-11 M

NB1 - неблокатор

[0207] Как указано в Таблице 12, в первом формате теста,

23 из 27 антител против PD-1 блокировали 1,5 нМ hPD-1-mFc от связывания с hPD-L1-hFc со значениями IC₅₀ в интервале от 190 пМ до 3,3 нМ с процентной максимальной блокировкой в интервале от 67% до 100%. Одно антитело, H2aM7796N, было идентифицировано, как неблокатор. Три антитела против PD-1 (H4H9068P2, H1M7789N, и H2aM7791N) идентифицировали как неблокаторы/энхансеры.

[0208] Как показано в Таблице 13, во втором формате теста, 23 из 27 антител против PD-1 блокировали 200 пМ биот-hPD-1-hFc от связывания с hPD-L1-mFc со значениями IC₅₀ в интервале от 59 пМ до 1,3 нМ процентной максимальной блокировкой в интервале от 60% до 101%. Одно антитело, H1M7789N, было идентифицировано, как неблокатор. Три антитела против PD-1 (H4H9057P2, H4H9068P2, и H2aM7791N) идентифицировали как неблокаторы/энхансеры.

[0209] В третьем формате теста, как показано в Таблице 14, тестировали четыре антитела против PD-1 изобретения, и Изотипический контроль. Все 4 антитела против PD-1 изобретения блокировали 100 пМ (фиксированную концентрацию) hPD-1-mFc от связывания с покрытием hPD-L2-hFc на планшете со значениями IC₅₀ в интервале от 0,13 нМ до 1,3 нМ и с процентной максимальной блокировкой в интервале от 94% до 100%.

Пример 5: Блокирование связывания PD-1 с PD-L1, определенное посредством биосенсорного теста и поверхностного плазмонного резонанса

[0210] Ингибирование PD-1 человека от связывания с человеческим PD-L1 посредством различных моноклональных антител против PD-1 исследовали, используя либо тест с интерферометрией биослоя в режиме реального времени на биосенсорном приборе Octet Red96 (Fortebio Inc.) или применяя тест с поверхностным плазмонным резонансом биосенсора в режиме реального времени на приборе Biacore 3000.

[0211] Исследования ингибирования моноклональных антител против PD-1, экспрессируемых с мышинным Fc, проводили на приборе Octet Red 96. Сначала, 100 нМ рекомбинантного PD-1 человека, экспрессируемого с C-концевой Fc меткой мышинового IgG2a (hPD-1-mFc; SEQ ID NO: 323) инкубировали с 500 нМ каждого моноклонального антитела против PD-1 в течение, по меньшей

мере, 1 часа перед началом теста на ингибирование assay. Приблизительно 0,8 нМ-1,2 нМ рекомбинантного человеческого PD-L1, экспрессируемого с С-концевой Fc меткой человеческого IgG1 (hPD-L1-hFc; SEQ ID NO: 325) подвергались захвату с использованием захвата Fc против человеческого IgG биосенсором Octet. Биосенсоры Octet, покрытые hPD-L1-hFc, затем погружали в лунки, содержащие смесь hPD-1-mFc и различных моноклональных антител против-PD-1. Весь эксперимент проводили при 25°C в буфере Octet HBST (0,01 М HEPES pH7,4, 0,15M NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% об/об поверхностно-активного вещества P20, 0,1 мг/мл BSA) при встряхивании планшета со скоростью 1000 об/мин. Биосенсоры промывали в буфере Octet HBST между каждой стадией эксперимента. Ответы связывания в режиме реального времени регистрировали в течение всего прохождения эксперимента и ответ связывания в конце каждой стадии записывали. Связывание hPD-1-mFc с захваченным hPD-L1-hFc сравнивали в присутствии и отсутствии различных моноклональных антител против-PD-1 и использовали для определения блокирующего поведения тестируемых антител, как показано в Таблице 15.

Таблица 15

Ингибирование связывания человеческого PD-L1 с PD-1 моноклональными антителами против PD-1, экспрессируемыми с мышинным Fc, измеренное на приборе OctetRed 96

Антитело против PD-1	Количество hPD-L1-hFc Captured (нМ)	Связывание смеси 100 нМ hPD-1-mFc и 500 нМ моноклонального антитела против-PD-1 (нМ)	% Блокирования
Нет антитела	0,77	0,07	0
H2aM7780N	1,07	-0,01	114
H2aM7788N	0,74	0,00	100
H1M7789N	0,80	0,05	29
H2aM7790N	0,90	-0,01	114
H2aM7791N	1,17	0,23	-229

H2aM7794N	0,87	-0,01	114
H2aM7795N	0,28	-0,01	114
H2aM7796N	0,82	-0,02	129
H2aM7798N	0,85	0,01	86
H1M7799N	0,79	0,00	100
H1M7800N	0,96	0,00	100

[0212] Как показано в Таблице 15, 9 из 11 антител против PD-1, протестированных на приборе Octet Red 96, демонстрировали сильное блокирование hPD-1-mFc от связывания с hPD-L1-hFc в интервале от 86% до полного блокирования связывания. Одно протестированное антитело против PD-1 (H1M7789N) показало более слабое блокирование связывания hPD-1-mFc с hPD-L1-hFc с 29% блокировкой. Одно протестированное антитело (H2aM7791N) демонстрировало способность усиливать связывание hPD-1-mFc с hPD-L1-hFc.

[0213] Далее, исследования ингибирования для моноклональных антител против PD-1, экспрессируемых с человеческим Fc, проводили на приборе Biacore 3000. Сначала, 100 нМ рекомбинантного PD-1 человека, экспрессируемого с С-концевой Fc меткой человеческого IgG1 (hPD-1-hFc; SEQ ID: 324) инкубировали с 500 нМ каждого моноклонального антитела против PD-1 в течение, по меньшей мере, 2 часов до прохождения теста на ингибирование. Поверхность сенсора CM5 Biacore сначала дериватизировали поликлональными кроличьими антителами против мышиных антител (GE Catalog# BR-1008-38), используя стандартную химию EDC-NHS. Приблизительно 730 RU рекомбинантного человеческого PD-L1, экспрессируемого с С-концевой Fc меткой мышиного IgG2a (hPD-L1.mFc; SEQ ID: 326) затем подвергали захвату с последующей инъекцией 100нМ hPD-1.hFc в присутствии и отсутствии различных моноклональных антител против PD-1 при скорости потока, равной 25 мкл/мин в течение 3 минут. Весь эксперимент проводили при 25°C в подвижном буфере, содержащем 0,01 М HEPES pH7,4, 0,15М NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% об/об поверхностно-активное вещество Tween-20 (подвижный буфер HBS-ET). Ответы связывания в режиме реального времени

регистрировали в течение всего эксперимента, и ответ связывания в конце каждой стадии записывали. Связывание hPD-1-hFc с захваченным hPD-L1-mFc сравнивали в присутствии и отсутствии различных моноклональных антител против-PD-1 и применяли для определения блокирующего поведения тестируемых антител, как показано в Таблице 16.

Таблица 16

Ингибирование связывания человеческого PD-L1 с PD-1 моноклональными антителами против PD-1, экспрессируемые с человеческим Fc, измеренное на приборе Biacore 3000

Моноклональное антитело против PD-1	500нМ моноклонального антитела против PD-1 (RU)	Связывание смеси 100нМ hPD-1.hFc и 500 нМ моноклонального антитела против PD-1 (RU)	% Блокирования
Без антитела	N/A	100±1,78	N/A
H4H9019P	-2	-1	101
H4xH9034P	-4	-5	105
H4xH9035P	-3	-4	104
H4xH9037P	-4	-4	104
H4xH9045P	-4	-5	105
H4H9048P2	-7	9	91
H4H9057P2	58	57	43
H4H9068P2	-2	365	-265
H4xH9119P2	-5	-5	105
H4xH9120P2	1	0	100
H4xH9128P2	-5	-5	105
H4xH9135P2	-3	-3	102
H4xH9145P2	-8	-6	106
H4xH8992P	3	2	98
H4xH8999P	1	0	100
H4xH9008P	0	1	99
H4H7795N2	-5	-6	106
H4H7798N	-6	-6	106
H4H9008P	-7	-7	107
H4H9048P2	-4	6	94

[0214] Как показано в Таблице 16, 18 из 20 антител изобретения против PD-1, протестированных на приборе Biacore 3000, показали сильное блокирование hPD-1-hFc от связывания с hPD-L1-mFc с показателем блокировки в интервале от 96% до 100%. Одно антитело демонстрировало способность усиливать связывание hPD-1-hFc с hPD-L1-mFc. В этом исследовании, одно из протестированных антител изобретения (H4H9057P2) демонстрировало неспецифическое фоновое связывание с поверхностью захвата против мышинового Fc.

Пример 6: Перекрестное конкурирование между антителами против PD-1 на Octet

[0215] Конкуренцию за связывание между моноклональными антителами против PD-1 определяли, используя тест с интерферометрией в режиме реального времени, биосенсор без метки на биосенсоре Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.). Весь эксперимент проводили при 25°C в 0,01 М HEPES pH7,4, 0,15М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% об/об поверхностно-активного вещества Tween-20, 0,1 мг/мл BSA (Octet HBS-ET буфер) при встряхивании планшета со скоростью 1000 об/мин. Чтобы оценить, способны ли 2 антитела конкурировать друг с другом за связывание с их соответствующими эпитопами на рекомбинантно экспрессируемом PD-1 человека с С-концевой мус-мус-гексагистидиновой меткой (hPD-1-ММН; SEQ ID: 321), сначала проводили захват приблизительно 0,1 нМ hPD-1-ММН поверхностью наконечников биосенсора Octet, покрытых антителом против Пента-His (Pall ForteBio Corp., # 18-5079) посредством погружения наконечников в течение 5 минут в лунки, содержащие раствор 50 мкг/мл hPD-1-ММН. Наконечники биосенсора с захваченным антигеном затем насыщали первым моноклональным антителом против PD-1 (в дальнейшем именуемым mAb-1) посредством погружения в лунки, содержащие раствор 50 мкг/мл mAb-1 в течение 5 минут. Наконечники биосенсора затем последовательно погружали в лунки, содержащие раствор 50 мкг/мл второго моноклонального антитела против PD-1 (в дальнейшем именуемого mAb-2). Наконечники биосенсора промывали в буфере Octet HBS-ET между каждой стадией эксперимента. Ответ связывания в режиме реального времени регистрировали в ходе

эксперимента и ответ связывания в конце каждой стадии записывали. Ответ связывания mAb-2 с hPD-1-ММН, предварительно образовавшего комплекс с mAb-1, сравнивали, и определяли конкурентное/неконкурентное поведение различных моноклональных антител против PD-1. Результаты обобщены в Таблице 17 (*Самоконкурирующие mAb2 не приведены).

Таблица 17

Перекрестная конкуренция между парами выбранных антител против PD-1

Первое применяемое антитело applied ("mAb1")	mAb2 антитела, с показанной конкуренцией с mAb1*
H4xH8992P	H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N
H4xH8999P	H4xH8992P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H4xH9008P
H1M7799N	H4xH8992P, H4xH8999P, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N

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

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

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

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

[0216] Вторую конкуренцию за связывание между панелью выбранных моноклональных антител против-PD-1 определяли, используя тест с интерферометрией в режиме реального времени, биослая без метки на биосенсоре Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.). Весь эксперимент проводили при 25°C в 0,01 М HEPES pH7,4, 0,15M NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% об/об поверхностно-активного вещества Tween-20, 0,1 мг/мл BSA (Octet HBS-ET буфер) при встряхивании планшета со скоростью 1000 об/мин. Чтобы оценить, способны ли 2 антитела конкурировать друг с другом за связывание с их соответствующими эпитопами на hPD-1-ММН, сначала проводили захват приблизительно 0,25 нМ hPD-1-ММН на поверхности наконечников биосенсора Octet, покрытых антителом против Пента-His (ForteBio Inc, # 18-5079), посредством погружения наконечников на 150 секунд в лунки, содержащие

раствор 10 мкг/мл hPD-1-ММН. Наконечники биосенсора с захваченным антиген затем насыщали первым моноклональным антителом против PD-1 (в дальнейшем называемым mAb-1) посредством погружения в лунки, содержащие раствор 100 мкг/мл mAb-1 на 5 минут. Наконечники биосенсора затем последовательно погружали в лунки, содержащие раствор 100 мкг/мл второго моноклонального антитела против PD-1 (в дальнейшем называемого mAb-2) на 4 минуты. Все биосенсоры промывали в буфере Octet HBS-ET между каждой стадией эксперимента. Ответ связывания в режиме реального времени регистрировали в ходе эксперимента и ответ связывания в конце каждой стадии записывали, как показано на Фиг. 2. Ответ связывания mAb-2 с hPD-1-ММН, предварительно образовавшего комплекс с mAb-1 сравнивали и определяли конкурентное/неконкурентное поведение различных моноклональных антител против PD-1. Результаты обобщены в Таблице 18 (*Самоконкурирующие mAb2 не приведены).

Таблица 18

Перекрестная конкуренция между парами выбранных антител против PD-1

Первое применяемое антитело ("mAb1")	Антитела mAb2 с показанной конкуренцией с mAb1*
H4H7795N2	H4H7798N
H4H7798N	H4H7795N2; H4H9008P
H4H9008P	H4H7798N; H4H9068P2
H4H9068P2	H4H9008P; H4H9048P2
H4H9048P2	H4H9068P2

[0217] При экспериментальных условиях, раскрытых в данном Примере, H4H7795N2 перекрестно конкурировало с H4H7798N; H4H7798N перекрестно конкурировало с H4H7795N2 и H4H9008P; H4H9008P перекрестно конкурировало с H4H7798N и H4H9068P2; H4H9068P2 перекрестно конкурировало с H4H9008P и H4H9048P2.

Пример 7: Связывание антитела с клетками, сверхэкспрессирующими PD-1

[0218] Связывание антител против PD-1 с человеческой линией эмбриональных клеток почки (HEK293; ATCC, #CRL-1573),

стабильно трансфицированных непрцессированным PD-1 человека (аминокислоты 1-289 с учетным номером NP_005009.2) (HEK293/hPD-1), определяли посредством FACS.

[0219] Для теста адгезивные клетки отсоединяли с использованием трипсина или безферментного диссоциационного буфера и блокировали полной средой. Клетки центрифугировали и ресуспендировали при концентрации, равной $2,5-6 \times 10^6$ клеток/мл, в холодном PBS, содержащем 2% FBS. Родительские клетки HEK293 и клетки HEK293/hPD-1 затем инкубировали в течение 15-30 мин на льду с использованием 100 нМ каждого антитела против PD-1. Несвязанные антитела удаляли промывкой D-PBS, содержащим 2% FBS, и клетки последовательно инкубировали с аллофикоцианин-конъюгированным вторичным F(ab')₂, распознающим либо человеческий Fc (Jackson ImmunoResearch, # 109-136-170) или мышинный Fc (Jackson ImmunoResearch, #115-136-146) в течение 15-30 минут на льду. Клетки промывали D-PBS, содержащим 2% FBS, для удаления несвязанного вторичного F(ab')₂ и измерения флуоресценции проводили, используя либо проточный цитометр HyperCyt (IntelliCyt, Inc.) или проточный цитометр Accuri (BD Biosciences). Данные анализировали, используя программное обеспечение FlowJo (Tree Star).

Таблица 19

Связывание антител против PD-1 с клетками HEK293/hPD-1 и родительскими клетками HEK293 по данным FACS

Антитело	FACS на родительских клетках HEK293 [MFI]	FACS на клетках HEK293/hPD-1 [MFI]	Отношение клеток HEK293/hPD-1 к родительским клеткам HEK293
H1M7789N	262	24166	92,3
H1M7799N	255	6855	26,9
H1M7800N	275	6812	24,7
H2aM7780N	320	23656	73,8
H2aM7788N	305	23112	75,7
H2aM7790N	270	47310	175,5
H2aM7791N	274	4948	18,0

H2aM7794N	270	19127	71,0
H2aM7795N	288	817	2,8
H2aM7796N	297	49755	167,8
H2aM7798N	300	23443	78,1
H4H9019P	111	8610	77,2
H4H9057P2	141	6501	46,1
H4H9068P2	285	1940	6,8
H4xH8992P	358	17502	48,9
H4xH8999P	809	28875	35,7
H4xH9008P	509	26233	51,5
H4xH9034P	147	10115	69,0
H4xH9035P	108	9915	91,7
H4xH9037P	108	8787	81,4
H4xH9045P	95	8884	93,7
H4xH9048P2	102	7196	70,8
H4xH9119P2	109	9142	84,0
H4xH9120P2	109	9975	91,9
H4xH9128P2	135	9081	67,5
H4xH9135P2	114	9380	82,2
H4xH9145P2	226	11552	51,2

[0220] Как показано в Таблице 19, 25 из 27 антител против PD-1 изобретения показывали сильное связывание с клетками HEK293/hPD-1 в сравнении со связыванием на родительской линии HEK293. Два антитела изобретения (H2aM7795N и H4H9068P2) связывались слабее с клетками, экспрессирующими PD-1 человека в сравнении с другими тестируемыми антителами.

[0221] Чтобы дополнительно характеризовать антитела изобретения против PD1, дозозависимое связывание с человеческой линией эмбриональных клеток почки (HEK293; ATCC, #CRL-1573) стабильно трансфицированных непрцессированным PD-1 человека (аминокислоты 1-289 с учетным номером NP_005009.2) (HEK293/hPD-1), определяли посредством FACS.

[0222] Для теста адгезивные клетки отсоединяли с использованием трипсина и блокировали полной средой. Клетки центрифугировали и ресуспендировали при концентрации, равной

6×10^6 клеток/мл в окрашивающем буфере (1% FBS в PBS). Для определения EC_{50} и E_{max} антител против PD1, 90 мкл суспензии клеток инкубировали в течение 30 минут на льду с серийным разведением антител против PD-1 и контролей, разбавленных до конечной концентрации в интервале от 5 пМ до 100 нМ (ни одного образца mAb не было включено как отрицательного контроля) в окрашивающем буфере. Клетки затем центрифугировали и ступки однократно промывали окрашивающим буфером для удаления несвязанных антител. Клетки последовательно инкубировали в течение 30 минут на льду либо с аллофикоцианин-конъюгированных вторичным F(ab')₂, распознающим человеческий Fc (Jackson ImmunoResearch, # 109-136-170) или мышиный Fc (Jackson ImmunoResearch, #115-136-071). Клетки центрифугировали и ступки однократно промывали окрашивающим буфером для удаления несвязанного вторичного F(ab')₂, и затем фиксировали в течение ночи с использованием 1:1 разведения Cytofix (BD Biosciences, # 554655) и окрашивающего буфера. На следующий день, клетки центрифугировали и ступки однократно промывали окрашивающим буфером, ресуспендировали и отфильтровывали. Измерения флуоресценции проводили на цитометре Hypercyt® и анализировали в ForeCyt™ (IntelliCyt; Albuquerque, NM) для определения средних интенсивностей флуоресценции (MFI). Значения EC_{50} рассчитывали по четырехпараметрическому логистическому уравнению для 11-точечной кривой ответа, используя GraphPad Prism. E_{max} для каждого антитела определяли как связывание при наивысшей дозе тестируемого антитела (100 нМ).

Таблица 20: Дозозависимое FACS-связывание антител против PD-1 с клетками HEK293/hPD-1

Антитело	EC_{50} [М]	Макс. геометр. среднее [MFI] @ 100нМ
H2aM7779N	2,59E-09	16832
H2aM7780N	1,69E-09	18415
H2aM7781N	5,67E-10	13740
H2aM7782N	1,26E-09	17302
H2aM7787N	2,40E-09	15744

H2aM7788N	3,21E-10	14827
H2aM7790N	1,71E-10	19196
H2aM7791N	EC ₅₀ не определено	1397
H2aM7794N	1,37E-09	16406
H2aM7795N	EC ₅₀ не определено	624
H2aM7798N	6,985E-11	20900
H1M7799N	3,318E-11	24405
H1M7800N	4,80E-11	20763
H4xH8992P	5,45E-11	11368
H4xH8999P	5,27E-11	28341
H4H9019P	1,40E-09	29201
H4xH9034P	2,09E-10	32388
H4xH9035P	1,15E-10	28708
H4xH9037P	6,74E-10	36441
H4xH9045P	9,17E-11	24662
H4xH9048P2	6,68E-10	33687
H4H9057P2	2,363E-10	19953
H4H9068P2	EC ₅₀ не определено	639
H4xH9119P2	3,476E-10	37789
H4xH9120P2	4,797E-10	34057
H4xH9128P2	1,551E-09	37167
H4xH9135P2	1,048E-10	32793
H4xH9145P2	2,321E-10	30613
mIgG1 изотип	N/A	200
mIgG2a изотип	N/A	239
hIgG4 изотип	N/A	459

Таблица 21

Дозозависимое FACS-связывание антител
против PD-1 с клетками HEK293/hPD-1

Антитело	EC ₅₀ [M]	Макс геом. среднее [MFI] @ 100нМ
H4H7795N2	Неокончательная	15188
H4H7798N	5,09E-10	20305

H4H9008P	Неокончательная	32230
H4H9048P2	1,60E-09	39774
H1M7789N	Неокончательная	35574
H2aM7796N	4,81E-09	14111
mIgG1 изотип	N/A	858
mIgG2a изотип	N/A	352
hIgG4 изотип	N/A	809

[0223] Как показано в Таблице 20, 25 из 28 антител против PD1 изобретения показали дозозависимое связывание с клетками HEK293/hPD-1 со значениями EC_{50} в интервале от 33,18 пМ до 2,59 нМ и значениями E_{max} в интервале от 37,789 до 11,368 MFI. Три антитела изобретения против PD1 не демонстрировали сильного связывания с клетками HEK293/hPD-1, и, следовательно, значение не могло быть определено. Ни один из изотипических контролей не демонстрировал какого-либо измеряемого связывания в данном тесте.

[0224] Как показано в Таблице 21, 3 из 6 антител против PD1 изобретения показали дозозависимое связывание с клетками HEK293/hPD-1 со значениями EC_{50} в интервале от 509 пМ до 4,81 нМ и значения E_{max} в интервале от 39,774 до 14,111 MFI. Три тестированных антитела изобретения связывались с клетками HEK293/hPD-1, но не достигали плато. Следовательно, их точные значения EC_{50} не могли быть определены и их значения EC_{50} считаются неокончательными. Ни один из изотипических контролей не демонстрировал какого-либо измеряемого связывания в данном тесте.

Пример 8: Блокирование PD-1-индуцированной понижающей регуляции Т-клеток в тесте с Т-клеточным/APC люциферазным репортером

[0225] Активация Т-клеток достигается посредством стимуляции Т-клеточных рецепторов (TcR), которые распознают конкретные пептиды, представленные основными белками комплекса гистосовместимости класса I или II на антигенпрезентирующих клетках (APC). Активированные TcR в свою очередь инициируют каскад событий передачи сигналов, которые могут

регистроваться репортерными генами, управляемыми факторами транскрипции, такими как активаторный белок 1 (AP-1), ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) или энхансер ядерного фактора каппа-легкой цепи активированных В-клеток (NFκb). Т-клеточный ответ модулируется через мобилизацию корцепторов, экспрессируемых либо конститутивно или индуцируемо на Т-клетках. Одним таким рецептором является PD-1, отрицательный регулятор Т-клеточной активности. PD-1 взаимодействует со своим лигандом, PD-L1, который экспрессируется на целевых клетках, включающих APC или опухолевые клетки, и действует для доставки ингибиторных сигналов посредством рекрутинга фосфатаз к TcR сигналосоме, что приводит в результате к подавлению положительной передачи сигналов.

[0226] Способность антител против PD-1 антагонизировать PD-1/PD-L1-опосредованную передачу сигналов через рецептор PD-1 в человеческих Т-клеточных линиях оценивали, используя аналитический тест *in vitro* на клеточной основе, показанный на Фиг. 1. Биотест был разработан для измерения передачи сигналов Т-клетками, индуцированной взаимодействием между APC и Т-клетками с использованием смешанной культуры, полученной из двух клеточных линий млекопитающих: Клеток Юркат (линия иммортализованных Т-клеток) и клеток Раджи (линия В-клеток). Для первого компонента биотеста, клетки Юркат клона Е6-1 (ATCC, #TIB-152) трансдуцировали с использованием репортера Signal Lenti AP-1 Luc (Qiagen-Sabiosciences, #CLS-011L) в соответствии с инструкциями производителя. Lentivirus кодирует ген люциферазы светлячка под управлением минимального CMV промотора, тандемные повторы элемента TPA-индуцируемого транскрипционного ответа (TRE) и ген резистентности к пуромицину. Сконструированную клеточную линию Юркат последовательно трансдуцировали химерой PD-1, содержащей внеклеточный домен PD-1 человека (аминокислоты от 1 до 170 человеческого PD1; учетный номер NP_005009.2) и трансмембранный и цитоплазматический домены человеческого CD300a (аминокислоты от 181 до 299 человеческого CD300a; учетный номер NP_009192.2).

Полученную в результате стабильную клеточную линию (Юркат/AP1-Luc/hPD1-hCD300a) отбирали и поддерживали в RPMI/10% FBS/пенициллин/стрептомицин/глутамин, дополненной 500 мкг/мл G418+1 мкг/мл пурамицина.

[0227] Для второго компонента биотеста, клетки Раджи (ATCC, #CCL-86) трансдуцировали с использованием человеческого гена PD-L1 (аминокислоты 1-290 из учетного номера NP_054862.1), которые клонировали в лентивирусную (pLEX) векторную систему (Thermo Scientific Biosystems, #OHS4735). Клетки Раджи, положительные к PD-L1 (Раджи/ hPD-L1), изолировали посредством FACS, используя антитело к PD-L1, и поддерживали в Iscove/10% FBS/пенициллин/стрептомицин/глутамин, дополненной 1 мкг/мл пурамицина.

[0228] Для стимуляции взаимодействия APC/Т-клетки, использовали биспецифическое антитело, состоящее из одного плеча Fab, которое связывается с CD3 на Т-клетках, и другое одно плечо связывания Fab, которое связывается с CD20 на клетках Раджи (биспецифическое антитело CD3xCD20; например, как раскрыто в US20140088295). Присутствие биспецифической молекулы в аналитическом тесте приводит к активации Т-клеток и APC посредством образования мостиков между субъединицами CD3 на Т-клетках с CD20, эндогенно экспрессируемыми в клетках Раджи. Было продемонстрировано, что лигирование CD3 с антителами против CD3 ведет к активации Т-клеток. В данном биотесте, антитела, блокирующие взаимодействие PD1/PD-L1, спасают активность Т-клеток посредством выведения из строя ингибиторного сигнального пути, что впоследствии приводит к увеличенной активации AP1-Luc.

[0229] В люциферазном биотесте, RPMI1640, дополненную 10% FBS и пенициллин/стрептомицин/глутамином, применяли в качестве аналитической среды для получения клеточных суспензий и разведений антитела для проведения скрининга моноклональных антител (mAbs) против PD1. В день скрининга, определяли значения EC50 mAbs против PD1, в присутствии фиксированной концентрации биспецифического антитела CD3xCD20 (30 пМ), а также EC50 для отдельного биспецифического антитела. В

следующем порядке клетки и реагенты добавляли в 96-луночные белые, плоскодонные планшеты. Для определений EC₅₀ mAb против PD1, получали первую фиксированную концентрацию биспецифического антитела CD3xCD20 (окончательная 30 пМ) и добавляли в лунки планшета для микротитрования. Затем добавляли 12-точечные серийные разведения mAb против PD1 и контроли (конечные концентрации в интервале от 1,7 пМ до 100 нМ; плюс лунки со средой для анализа по отдельности). Для определения EC₅₀ биспецифического антитела (отдельно взятого), биспецифическое антитело, при конечных концентрациях в интервале от 0,17 пМ до 10 нМ (плюс лунки со средой для анализа по отдельности), добавляли в лунки планшета для микротитрования. Последовательно получали суспензию с $2,5 \times 10^6$ /мл клеток Раджи/hPD-L1, и добавляли 20 мкл на лунку (при конечном числе 5×10^4 клеток/лунку). Планшеты оставляли при комнатной температуре (15-20 минут), в то время как получали суспензию с $2,5 \times 10^6$ /мл Юркат/AP1-Luc/hPD1(ecto)-hCD300a(ТМ-Цито). 20 мкл суспензии клеток Юркат (при конечном числе 5×10^4 клеток/лунку) добавляли в лунку. Планшеты, содержащие совмещенную культуру, инкубировали в течение 5-6 часов при 37°C/5% CO₂. Образцы тестировали в двух повторностях, и люциферазную активность затем обнаруживали после добавления реагента ONE-Glo™ (Promega, # E6051), а относительные световые единицы (RLU) измеряли на люминометре Виктора.

[0230] Значения RLU для каждого скринированного антитела нормализовали посредством установки условия анализа с фиксированной (30 пМ) концентрацией биспецифического антитела CD3/CD20, но без антитела против PD-1, до 100%. Это условие соответствует максимальному ответу AP1-Luc, вызываемому биспецифической молекулой в присутствии ингибиторного сигнала PD-1/PD-L1. При добавлении антитела против PD-1, ингибиторный сигнал подавляется, и увеличенная стимуляция показана здесь как E_{max}, процентное увеличение сигнала в присутствии наивысшей тестируемой дозы антитела (100 нМ). Для сравнения активности тестируемого антитела против PD1, концентрация антитела, при

которой нормализованное значение RLU достигало 150% активации, определяли из четырехпараметрическому логистическому уравнению для 12-точечной кривой ответа, используя GraphPad Prism. Результаты обобщены в Таблице 22 и Таблице 23, соответственно.

Таблица 22

Блокирование антителом против PD1 PD-1/PD-L1-зависимого ингибирования сигнального пути AP1-Luc в Эксперименте 1

Антитело	Антагонистический анализ Концентрация (M) антитела при 150% активации Эксперимент 1	Антагонистический анализ E_{max} средн. [%] @ 100 нМ Эксперимент 1
H1M7789N	N/A	135
H1M7799N	2,97E-08	183
H1M7800N	1,65E-08	182
H2aM7779N	8,92E-09	214
H2aM7780N	6,52E-09	228
H2aM7781N	6,70E-09	230
H2aM7782N	9,96E-09	215
H2aM7787N	1,38E-08	215
H2aM7788N	4,72E-09	189
H2aM7790N	5,24E-09	234
H2aM7791N	N/A	103
H2aM7794N	4,09E-08	170
H2aM7795N	N/A	109
H2aM7796N	N/A	121
H2aM7798N	7,99E-10	239
H4H9019P	1,79E-08	180
H4xH9034P	2,62E-09	202
H4xH9035P	1,20E-09	227
H4xH9037P	2,82E-09	195
H4xH9045P	2,23E-08	176
H4xH9048P2	N/A	138
H4H9057P2	2,68E-08	212
H4H9068P2	N/A	102
H4xH9119P2	1,11E-08	163

H4xH9120P2	1,10E-08	166
H4xH9128P2	3,99E-09	187
H4xH9135P2	1,55E-09	193
H4xH9145P2	2,40E-09	185
H4xH8992P	5,32E-09	178
H4xH8999P	8,63E-10	217
H4H7798N	1,54E-09	202
mIgG1 изотипический контроль	N/A	92
mIgG2a изотипический контроль	N/A	91
hIgG4 изотипический контроль	N/A	94

N/A=неприменимо, так как при тестируемых концентрациях эти антитела не активируют 150%

Таблица 23

Блокирование антителом против PD1 PD-1/PD-L1-зависимого ингибирования сигнального пути AP1-Luc в Эксперименте 2

Антитело	Антагонистический анализ Концентрация (M) антитела при 150% активации Эксперимент 2	Антагонистический анализ E_{max} средн. [%] @ 100 нМ Эксперимент 2
H4H7795N2	N/A	110
H4H7798N	1,59E-10	343
H4H9008P	9,84E-08	150
H4H9048P	N/A	134
hIgG4 изотипический контроль	N/A	98

N/A=неприменимо, так как при тестируемых концентрациях эти антитела не активируют 150%

[0231] Как показано в Таблице 22, 25 из 31 протестированного антитела изобретения против PD-1 блокировали ингибирование PD-1/PD-L1 со значениями E_{\max} в интервале от 239 до 163. Шесть из 31 антитела изобретения против PD-1 не демонстрировали существенной блокады взаимодействия PD1/PD-L1 при тестировании в данном анализе.

[0232] Как показано в Таблице 23, 2 из 4 протестированных антител изобретения против PD-1 блокировали ингибирование PD-1/PD-L1 со значениями E_{\max} , равными 150 и 343%, соответственно. 2 из 4 антител изобретения против PD-1 не демонстрировали существенной блокады взаимодействия PD1/PD-L1 при тестировании в данном анализе.

Пример 9: Эффективность действия антител против PD-1 *in vivo*

[0233] Чтобы определить эффект выбранного числа антител изобретения против PD-1 на релевантной модели *in vivo*, три исследования роста опухоли MC38.ova, включающие подкожную инъекцию опухолевых клеток и начинающиеся в различные Дни, проводили на мышах, которые были гомозиготными для экспрессии внеклеточного домена PD-1 человека вместо внеклеточного домена мышинового PD-1 (PD-1 мышей NumIn) на основе 75% штамма 129 C57/B16/25%.

[0234] Для исследований, мышей равномерно разделяли в соответствии с массой тела на 5 групп лечения или контрольных групп для Исследования 1 (5 мышей на группу), 8 групп лечения или контрольных групп для Исследования 2 (5 мышей на группу), и 5 групп лечения или контрольных групп для Исследования 3 (7 мышей на группу). В День 0, мышей подвергали анестезии посредством ингаляции изофлураном и затем вводили посредством подкожной инъекции в правый бок клетки 5×10^5 MC38.ova в суспензии 100 мкл DMEM для Исследования 1 или клетки 1×10^6 MC38.ova в суспензии 100 мкл DMEM для Исследования 2 и Исследования 3. Для Исследования 1, группам лечения вводили посредством внутривенной инъекции 200 мкг либо одно из трех антител изобретения против PD-1, или изотипическое контрольное

антитело с нерелевантной специфичностью в Дни 3, 7, 10, 14 и 17 эксперимента, в то время как одна группа мышей не подвергалась лечению. Для Исследования 2 группам лечения вводили посредством внутрибрюшинной инъекции либо одно из трех антител изобретения против PD-1 при 10 мг/кг или 5 мг/кг на дозу, одно антитело изобретения (H4H7795N2) при 10 мг/кг на дозу, или изотипическое контрольное антитело с нерелевантной специфичностью при 10 мг/кг в Дни 3, 7, 10, 14 и 17 эксперимента. Для Исследования 3, группам лечения вводили посредством внутрибрюшинной инъекции либо одно из двух антител изобретения против PD-1 при 5 мг/кг или 2,5 мг/кг на дозу или изотипическое контрольное антитело с нерелевантной специфичностью при 5 мг/кг в Дни 3, 7, 10, 14 и 17 эксперимента. Экспериментальное дозирование и протокол лечения для групп мышей показаны в Таблице 24.

Таблица 24

Экспериментальное дозирование и протокол лечения для групп мышей

Исследование #	Тестируемые образцы	Дозируемое количество в каждой временной отметке дозирования	Интервал дозирования
1	Изотипический контроль	200 мкг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	Без лечения	N/A	N/A
	H4H7798N	200 мкг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7795N2	200мкг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	200 мкг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
2	Изотипический контроль	10 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7795N2	10 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7798N	10 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17

	H4H7798N	5 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9048P2	10 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9048P2	5 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	10 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	5 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
3	Изотипический контроль	5 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7798N	5 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7798N	2,5 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	5 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	2,5 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17

[0235] Для исследований, регистрировали средний объем опухолей, определенный посредством измерений циркулем, и процент выживаемости в День 14 или 17 и День 23 или 24 каждого эксперимента для каждой группы лечения. В дополнение, также оценивали число безопухолевых мышей в конце исследования (День 42 для Исследования 1 и День 31 для Исследования 2 и Исследования 3). Результаты, выраженные в виде среднего объема опухоли (мм^3) ($\pm\text{SD}$), процента выживаемости и числа безопухолевых мышей, показаны в Таблице 25 для Исследования 1, Таблице 26 для Исследования 2 и Таблице 27 для Исследования 3.

Таблица 25

Средний объем опухоли, процент выживаемости и число безопухолевых мышей в каждой группа лечения по результатам Исследования 1
опухолей in vivo

Группа лечения (n=5)	Объем опухоли, мм^3 среднее ($\pm\text{CO}$)		Выживаемость, %		Безопухолевые мыши
	День 17	День 23	День 42	День 23	
					День 42

	200 мкг/мышь	200 мкг/мышь	200 мкг/мышь	200 мкг/мышь	200 мкг/мышь
Без лечения	189 (±110)	554 (±317)	1/5 (20%)	100%	1/5 (20%)
Изотипический контроль	86 (±114)	515 (±859)	2/5 (40%)	60%	2/5 (40%)
H4N7798N	0 (0)	0 (0)	5/5 (100%)	100%	5/5 (100%)
H4N9008P	14 (±19)	205 (±312)	3/5 (60%)	100%	3/5 (60%)
H4N7795N2	89 (±176)	445 (±889)	3/5 (60%)	80%	3/5 (60%)

[0236] Как показано в Таблице 25 для Исследования 1, у мышей, подвергнутых лечению одним антителом изобретения, H4N7798N, не развивались обнаруживаемые опухоли во время прохождения исследования. Мыши, подвергнутые лечению H4N9008P, проявляли пролонгированный сниженный объем опухоли в сравнении с контролями в Дни 17 и 24 исследования, причем 3 из 5 мышей или 4 из 5 мышей были безопухолевыми к концу эксперимента, соответственно. Напротив, лечение с использованием одного из антител против PD1, H4N7795N2, не демонстрировало существенной эффективности при снижении объема опухоли в данном исследовании в сравнении с контролями. Ко Дню 23 исследования, 1 из 5 мышей умерла в группе с H4N7795N2, и 2 из 5 мышей умерли в группе лечения изотипическим контролем. В группе без лечения и группе изотипического контроля несколько мышей проявляли спонтанную регрессию опухолей (1 из 5 мышей и 2 из 5 мышей, соответственно).

Таблица 26

Средний объем опухоли, процент выживаемости и число безопухолевых мышей в каждой группе лечения по результатам Исследования 2 опухоли in vivo

Группа лечения (n=5)	Объем опухоли, мм ³ средний (±SD)				Выживаемость, %				Безопухолевые мыши	
	Дни 17		День 24		День 17		День 24		День 31	
	5 мг/кг	10 мг/кг	5 мг/кг	10 мг/кг	5 мг/кг	10 мг/кг	5 мг/кг	10 мг/кг	5 мг/кг	10 мг/кг
Изотипический контроль	N/A	449 (±434)	N/A	824 (±858)	N/A	100%	N/A	60%	N/A	1/5 (20%)
H4N7798N	17 (±38)	0 (0)	104 (±233)	0 (0)	100%	100%	100%	100%	4/5 (80%)	5/5/(100%)
H4N9008P	91 (±204)	12 (±28)	228 (±509)	96 (±215)	100%	100%	80%	100%	4/5 (80%)	4/5 (80%)
H4N9048P2	94 (±160)	10 (±21)	328 (±559)	67 (±150)	100%	100%	80%	100%	3/5 (60%)	4/5 (80%)
H4N7795N2	N/A	124 (±209)	N/A	359 (±657)	N/A	100%	N/A	80%	N/A	2/5 (40%)

[0237] Как показано в Таблице 26 для Исследования 2, у мышей, подвергнутых лечению одним антителом изобретения, H4N7798N при 10 мг/кг, не развивались обнаруживаемые опухоли во время прохождения исследования. Группы мышей, подвергнутых лечению при 10 мг/кг либо H4N9008P или H4N9048P2, проявляли значительно сниженный объем опухоли в сравнении с контролями в Дни 17 и 24 исследования. Четыре из 5 мышей в каждой группе, подвергнутой лечению 10 мг/кг либо H4N9008P или H4N9048P2, были безопухолевыми в День 31, в то время как в группе лечения изотипическим контролем только 1 из 5 животных было безопухолевым в результате спонтанной регрессии опухоли. Одно антитело, тестируемое при 10 мг/кг, H4N7795N2, демонстрировало значительно уменьшенный объем опухоли в сравнении с контролями в Дни 17 и 24 исследования, но это антитело было наименее эффективным антителом против PD1, причем только 2 из 5 мышей, выжили в конце эксперимента.

[0238] Дозозависимый ответ при подавлении опухоли при тестируемых дозах (5 мг/кг и 10 мг/кг) наблюдали в группах, подвергнутых лечению H4N7798N, H4N9008P, и H4N9048P2. Терапия с использованием H4N7798N или H4N9008P при 5 мг/кг была менее эффективной, с 4 из 5 безопухолевых мышей в конце эксперимента в День 21, в то время как 5 из 5 мышей оставались безопухолевыми в обеих группах с дозой 10 мг/кг H4N7798N и H4N9008P.

[0239] Тест Даннета при двухфакторном дисперсионном анализе ANOVA множественных сравнений показал, что различия в росте опухолей между группой, подвергнутой лечению изотипическим контрольным антителом при 10 мг/кг, в качестве эталона, и группами, подвергнутыми лечению при 10 мг/кг либо H4N7798N, H4N9008P или H4N9048P2, были статистически значимыми со значением $p < 0,005$. Различия в росте опухоли между группой подвергнутой лечению изотипическим контрольным антителом при 10 мг/кг, в качестве эталона, и группами, подвергнутыми лечению при 5 мг/кг либо H4N7798N, H4N9008P или H4N9048P2 были также статистически значимыми со значением $p < 0,05$.

Таблица 27

Средний объем опухоли, процент выживаемости и число безопухолевых мышей в каждой группе лечения по результатам Исследования 3 опухолей in vivo

Группа лечения (n=7)	Объем опухоли, мм ³ среднее (±CO)				Выживаемость, %				Безопухолев. мыши	
	День 14		День 21		День 14		День 21		День 31	
	2,5 мг/кг	5 мг/кг	2,5 мг/кг	5 мг/кг	2,5 мг/кг	5 мг/кг	2,5 мг/кг	5 мг/кг	2,5 мг/кг	5 мг/кг
Изотип. контроль	N/A	94 (±44)	N/A	405 (±326)	N/A	100%	N/A	86%	N/A	0/7 (0%)
H4H7798N	0 (0)	0 (0)	19 (±51)	13 (±35)	100%	100%	100%	100%	6/7 (86%)	6/7 (86%)
H4H9008P	41 (±68)	7 (±20)	87 (±123)	16 (±42)	100%	100%	100%	100%	4/7 (57%)	6/7 (86%)

[0240] Как показано в Таблице 27 для Исследования 3, 6 из 7 мышей, подвергавшихся лечению одним антителом изобретения, H4N7798N, или еще одним антителом изобретения, H4N9008P, при 5 мг/кг были безопухолевыми в конце эксперимента, в то время как в группе изотипического контроля не было безопухолевых животных. Одна опухоленесущая мышь в контрольной группе с IgG4 умерла в День 17 после имплантации. Только 4 из 7 мышей, подвергавшихся лечению H4N9008P при дозе 2,5 мг/кг, оставались безопухолевыми в конце эксперимента. Различие в объемах опухолей на День 21 между группой с тестируемыми антителами против PD-1 и группой изотипического контроля было статистически значимым, как определяли посредством однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием множественного сравнения Даннета с $p < 0,01$. Все четыре антитела против PD-1 были равнозначно более эффективными при дозе 5 мг/кг, чем при дозе 2,5 мг/кг.

Пример 10: Протвоопухолевые эффекты комбинации антитела против PD-1 и антагониста VEGF на мышинной модели раннего лечения опухоли

[0241] Модель раннего лечения опухоли была разработана для тестирования эффективности действия комбинации антитела против PD-1 и антагониста VEGF. Для данной модели, комбинированную терапию вводят вскоре после имплантации опухоли. В эксперименте также применяли антитело против PD-L1 по отдельности и в комбинации с антагонистом VEGF. Антитело против PD-1, применяемое в данном эксперименте, представляло собой антитело против мышинового PD-1 клона "RPMI-14" с крысиным IgG2b (Bio X Cell, West Lebanon, NH). Антагонист VEGF, применяемый в данном эксперименте, представлял собой афлиберцепт (химерную молекулу на основе рецептора VEGF, также известную как "VEGF-ловушка" или "VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)", полное описание которой представлено в другом разделе настоящего описания). Антитело против PD-L1, применяем в данном эксперименте, представляло собой моноклональное антитело против PD-L1 с V_H/V_L последовательностями антитела "YW243.55S70" в соответствии с

US20100203056A1 (Genentech, Inc.), с мышинным IgG2a, и, которое имело перекрестную реактивность с мышинным PD-L1.

[0242] Для данной экспериментальной модели, $1,0 \times 10^6$ опухолевых клеток Colon-26 имплантировали подкожно мышам BALB/c в День 0. Начиная в День 3, перед установлением измеряемых опухолей, мышей подвергали лечению с использованием одной из моно- или комбинированных терапий или контрольной комбинации, как приведено в Таблице 28.

Таблица 28

Экспериментальное дозирование и группы лечения

Группа лечения	Первое средство	Второе средство
Контрольная комбинация	IgG2a изотипический контроль (250 мкг, ВВ)	hFc control (250 мкг, ПК)
только VEGF-Ловушка	IgG2a изотипический контроль (250 мкг, ВВ)	Афлиберцепт (10 мг/кг, ПК)
только против-PD-1	против-PD-1 mAb RPMI-14 (250 мкг, ВВ)	hFc control (250 мкг, ПК)
только против-PD-L1	против-PD-L1 mAb (250 мкг, ВВ)	hFc control (250 мкг, ПК)
VEGF-Ловушка + против-PD-1	против-PD-1 mAb RPMI-14 (250 мкг, ВВ)	Афлиберцепт (10 мг/кг, ПК)
VEGF-Ловушка + против-PD-L1	против-PD-L1 mAb (250 мкг, ВВ)	Афлиберцепт (10 мг/кг, ПК)

[0243] Различные терапии вводили в пяти различных временных отметках в течение двухнедельного периода (т.е., инъекции в День 3, День 6, День 10, День 13 и День 19).

[0244] Животных в каждой терапевтической группе оценивали с позиций появления опухоли, объема опухоли, среднего времени выживаемости, и числа безопухолевых животных ко Дню 50. Степень роста опухоли обобщена на Фиг. 2 (кривые роста опухоли) и Фиг. 3 (объем опухоли на День 28). Результаты также обобщены в Таблице 29.

Таблица 29

Безопухолевые мыши в группах лечения

Группа лечения	№ Безопухолевых животных на День 50
Контрольная комбинация	0/10
только VEGF-Ловушка	3/10
только против-PD-1	4/10
только против-PD-L1	5/10
VEGF-Ловушка + против-PD-1	7/10
VEGF-Ловушка + против-PD-L1	9/10

[0245] Рост опухоли значительно снижался у животных, подвергаемых лечению комбинацией VEGF-Ловушка + антитело против PD-1 в сравнении с режимами лечения, включающими оба терапевтических средства по отдельности (см. Фиг. 2 и 3). Кроме того, выживаемость существенно возрастала в группе VEGF-Ловушка + антитело против PD-1, причем, по меньшей мере, 70% животных выживали ко дню 50 после имплантации опухоли. Напротив, для групп с монотерапией антителом против PD-1 и VEGF-Ловушкой, выживаемость ко дню 50 составляла только 40% и 30% соответственно (см. Фиг. 3 и Таблица 29).

Пример 11: Клиническое испытание повторного дозирования с использованием антитела против PD-1 в качестве единственной терапии и в комбинации с другими противоопухолевыми терапиями у пациентов с опухолями на поздней стадии

[0246] Данное испытание представляет собой исследование с повышением дозы антитела против PD-1, по отдельности, или в комбинации с лучевой терапией, циклофосфамидом или обоими, у пациентов с опухолями на поздней стадии. Иллюстративное антитело против PD-1 ("mAb"), применяемое в данном Примере, содержит HCVR из SEQ ID NO: 162 и LCVR из SEQ ID NO: 170.

Цели клинического исследования

[0247] Первичной целью исследования является характеризовать безопасность, переносимость, DLT mAb, вводимых ВВ в виде монотерапии, или в комбинации с целенаправленным облучением (преднамеренно, чтобы оно служило в качестве

иммуностимулирующей терапии, в большей степени, чем, в основном, опухолеаблативной терапии), низкодозовым циклофосфамидом (терапией, которая продемонстрировала ингибирование регуляторных Т-клеточных ответов), или обоих вариантов, у пациентов с опухолями на поздней стадии.

[0248] Вторичными целями исследования являются: (1) определить рекомендованную дозу для фазы 2 (RP2D) mAb в качестве монотерапии и в комбинации с другими противоопухолевыми терапиями (целенаправленным облучением, низкодозовым циклофосфамидом или обоими); (2) описать предварительную противоопухолевую активность mAb, по отдельности и с каждым партнером (партнерами) комбинации; (3) характеризовать ФК mAb в качестве монотерапии и в комбинации с другими противоопухолевыми терапиями (целенаправленным облучением, низкодозовым циклофосфамидом или обоими); и (4) оценить иммуногенность mAb.

Проект исследования

[0249] Безопасность будет оцениваться в отдельных, стандартных 3+3 когортах с повышением дозы (при монотерапии, комбинации с лучевой терапией, комбинации с циклофосфамидом и комбинации с лучевой терапией плюс циклофосфамид). Выбор комбинированной терапии с облучением, циклофосфамидом или обоими будет основываться на оценке исследователем лучшего выбора терапии для индивидуального пациента при консультации со спонсором. Чтобы быть включенным в когорту для лучевой терапии, пациент должен иметь повреждение, которое может быть безопасно облучено, и для которого облучение при предусмотренных ограниченных, паллиативных дозах могло бы считаться соответствующим в медицинском отношении, и, по меньшей мере, одно другое повреждение, подходящее для оценки ответа. Пациент сможет участвовать, только если в когорте доступно вакантное место для выбранного лечения.

[0250] Пациенты будут проходить через процедуры скрининга для определения соответствия требованиям в интервале 28 дней перед начальным введением mAb. После включения пациентов в когорту монотерапии mAb, включение последующих когорт будет

определяться наличием DLT в предшествующих когортах (т.е., отсутствием DLT в когорте из 3 пациентов, или не более чем 1 DLT в расширенной когорте из 6 пациентов), и доступности вакантных мест для пациентов. Запланированные уровни дозы при монотерапии составляют 1, 3, или 10 мг/кг, вводимые ВВ каждые 14 дней (2 недели).

[0251] Как только периоды наблюдения для одной или обеих когорт с монотерапией по 1 мг/кг или 3 мг/кг mAb завершаются без DLT в когорте из 3 пациентов или с не более чем 1 DLT в расширенной когорте из 6 пациентов, пациенты могут быть включены в когорту с комбинированием циклофосфамида или лучевой терапией с mAb при таком же уровне дозы как для монотерапии. Пациенты могут быть включены в когорту с комбинацией mAb+циклофосфамид/лучевая терапия, как только периоды наблюдения DLT как для когорты с уровнем дозы mAb + циклофосфамид, так и для когорты с таким уровнем дозы mAb + такой же режим лучевой терапии завершаются без DLT в когорте из 3 пациентов, или с не более чем 1 DLT в расширенной когорте из 6 пациентов.

[0252] Как только период наблюдения DLT в когорте с монотерапией 3 мг/кг mAb завершается без DLT в когорте из 3 пациентов, или не более чем с 1 DLT в расширенной когорте из 6 пациентов, может быть также включена когорта с монотерапией 10 мг/кг mAb.

[0253] Когорты с монотерапией mAb 3 мг/кг и 10 мг/кг будут включены только тогда, когда требуемое число пациентов в когорте с монотерапией предшествующей дозой (т.е., 1 мг/кг и 3 мг/кг, соответственно) пройдет через день 28 периода наблюдения DLT без демонстрации максимальной переносимой дозы (MTD) для этого уровня дозы. Когорта 1 мг/кг mAb с комбинированным лечением будет включена только после завершения периода наблюдения DLT для когорты с монотерапией 1 мг/кг. Комбинированные когорты, получающие 3 мг/кг mAb, будут включены, только тогда, когда требуемое число пациентов в соответствующих комбинированных когортах с 1 мг/кг пройдет через период наблюдения DLT без демонстрации MTD. Когорты с

тройной комбинацией, сочетающие mAb с циклофосфамидом и режимом облучения будут включены только тогда, когда требуемое число пациентов в обеих соответствующих когортах с двойной комбинацией при данном уровне дозирования пройдет период наблюдения DLT без демонстрации MTD.

[0254] Таблица 30 обобщает когорты с повышением дозы, в которые будут включены пациенты.

Таблица 30

Возможные когорты с повышением дозы

n	Возможная заданная когорта лечения
3-6	монотерапия 0,3 мг/кг mAb (будет включена, только если MTD < 1 мг/кг mAb)
3-6	монотерапия 1 мг/кг mAb
3-6	монотерапия 3 мг/кг ¹⁾ mAb
3-6	монотерапия 10 мг/кг ²⁾ mAb
3-6	1 мг/кг ^a mAb + лучевая терапия (6 Гр×5)
3-6	1 мг/кг ^a mAb + лучевая терапия (9 Гр×3)
3-6	3 мг/кг ²⁾ (или MTD) mAb + циклофосфамид
3-6	3 мг/кг ²⁾ (или MTD) mAb + лучевая терапия (6 Гр×5)
3-6	3 мг/кг ²⁾ (или MTD) mAb + лучевая терапия (9 Гр×3)
3-6	3 мг/кг ²⁾ (или MTD) mAb + лучевая терапия (6 Гр×5) + циклофосфамид
3-6	3 мг/кг ²⁾ (или MTD) mAb + лучевая терапия (9 Гр×3) + циклофосфамид

[0255] DLT определяют как любое из следующих: негематологическая токсичность (например, увеит, или любое другое irAE), или гематологическая токсичность (например, нейтропения, тромбоцитопения, фебрильная нейтропения).

[0256] Максимальную переносимую дозу (MTD) определяют как наивысшую дозу, при которой менее чем треть расширенной когорты из 6 пациентов испытывают DLT во время первого цикла лечения. Таким образом, MTD определяют как уровень дозы сразу же ниже уровня, при котором дозирование останавливают вследствие наличия 2 или более DLT в расширенной когорте из 6 пациентов.

Если увеличение дозы не останавливают вследствие наличия DLT, будет считаться, что MTD не была определена. Возможно, что MTD может не определяться в данном исследовании, либо для группы монотерапии или для индивидуальных комбинированных групп. Дополнительно, возможно, что MTD для mAb могут различаться для монотерапии и каждого режима комбинированного лечения.

Продолжительность исследования

[0257] Пациенты будут получать до 48 недель лечения, после которых будет 24-недельный период последующего наблюдения. Пациент будет получать лечение пока не завершится 48-недельный период лечения, или до прогрессирования заболевания, неприемлемой токсичности, прекращения согласия или наступления соответствия еще одному критерию прекращения участия в исследовании. После минимального 24-недельного лечения, пациенты с подтвержденными полными ответами (CR) могут выбрать прерывание лечения и продолжение со всеми уместными оценками при исследовании (например, оценками эффективности). После минимального 24-недельного лечения, пациенты с оценками опухолевой нагрузки стабильного заболевания (SD) или частичного ответа (PR), у которых не произошло изменений в течение 3 последовательных опухолевых оценок могут также выбрать прерывание лечения и продолжение со всеми уместными оценками при исследовании (например, оценками эффективности).

Популяция исследования

[0258] Целевая популяция для данного исследования включает пациентов с опухолями на поздней стадии, которые не являются кандидатами для стандартной терапии, не желают проходить стандартную терапию, или для которых не ожидают благоприятного клинического эффекта от доступной терапии; и пациентов со злокачественными новообразованиями, которые являются неизлечимыми, и которые не имели реакции или продемонстрировали прогрессирование опухоли, несмотря на стандартную терапию.

[0259] Критерии включения: Пациент должен соответствовать следующим критериям, чтобы быть допущенным для включения в исследование: (1) демонстрировать прогрессирование солидной опухоли без альтернативной доступной терапевтической опции

стандартного лечения; (2) иметь, по меньшей мере, 1 повреждение для оценки ответа. Пациентам, которым назначена лучевая терапия, требуется, по меньшей мере, одно дополнительное повреждение, которое может быть безопасно облучено при умеренном показателе повреждений, и, для которого облучение при предусмотренных ограниченных, паллиативных дозах будет считаться соответствующим в медицинском отношении; (3) иметь показатель общего состояния по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG) ≤ 1 ; (4) быть старше 18 лет; (5) функция печени: а. общий билирубин $\leq 1,5$ x верхний предел нормы (ULN; если метастазы в печени ≤ 3 x мклN), б. трансаминазы ≤ 3 x мклN (или $\leq 5,0$ x мклN, если есть метастазы в печени), с. щелочная фосфатаза (ALP) $\leq 2,5$ x мклN (или $5,0$ x мклN, если есть метастазы в печени); (6) функция почек: креатинин в сыворотке $\leq 1,5$ x мклN; (7) число нейтрофилов (ANC) $\geq 1,5 \times 10^9$ /л, с. число тромбоцитов $\geq 75 \times 10^9$ /л; (8) способность предоставить подписанное информированное согласие; и (9) способность и желание соблюдать запланированные визиты, лечебные планы, прохождение лабораторных тестов и другие имеющие отношение к исследованию процедуры.

[0260] Критерии исключения: Пациент, который соответствует любому из следующих критериев, будет исключен из исследования: (1) Продолжающееся или недавнее (в интервале 5 лет) очевидное свидетельство значительного аутоиммунного заболевания, которое требует лечения с использованием системных иммуносупрессорных терапий, которые могут предположительно создать риск для irAE; (2) Предшествующее лечение средством, которое блокирует путь PD-1/PD-L1; (3) Предшествующее лечение другими иммуномодулирующими средствами в интервале менее 4 недель или 4 периодов полужизни, независимо от того, который больше, перед первой дозы mAb; (4) Примеры иммуномодуляторов включают блокаторы CTLA-4, 4-1BB (CD137), OX-40, терапевтические вакцины или цитокиновые терапии; (5) Не подвергавшиеся лечению метастазы в мозге, которые могут считаться активными. Пациенты с ранее подвергавшимися лечению метастазами в мозге могут

принять участие, при условии, что они являются стабильными (т.е., без явных признаков прогрессирования при визуализации, в течение, по меньшей мере, 4 недель перед первой дозой лечения при исследовании, и любые неврологические симптомы вернулись к исходному уровню), и отсутствуют явные новые или увеличенные метастазы в мозге; (6) Иммуносупрессорные дозы кортикостероидов (>10 мг преднизона или эквивалента ежедневно) в интервале 4 недель до первой дозы mAb; (7) Тромбоз глубоких вен, тромбоэмболия легочной артерии (включая асимптоматическую тромбоэмболию, идентифицируемую при визуализации), или другое тромбоэмболическое событие в интервале 6 месяцев, предшествующих первой дозе mAb; (8) Активная инфекция, требующая терапии, включающая известную инфекцию вирусом иммунодефицита человека, или активная инфекция вирусом гепатита В или гепатита С; (9) История пневмонии в интервале последних 5 лет; (10) Любое исследовательское или противоопухолевое лечение в интервале 30 дней перед начальным введением mAb; (11) История документированных аллергических реакций или острой реакции гиперчувствительности, относящейся к лечению терапий с использованием антител в целом, или к средствам, применяемым конкретно в исследовании; (12) Известная аллергия на доксоциклин или тетрациклин (предосторожность вследствие присутствия следовых компонентов в mAb); (13) Грудное вскармливание; (14) Положительный сывороточный тест на беременность; (15) История в интервале последних 5 лет инвазивного злокачественного новообразования, отличающегося от злокачественного новообразования, подвергаемого лечению в данном исследовании, за исключением иссеченной/подвергнутой абляции базальной или плоскоклеточной карциномы кожи или рака шейки матки *in situ*, или другие местные опухоли, считающиеся излеченными посредством местного лечения; (16) Острые или хронические психиатрические проблемы, которые, при оценке исследователем, делают пациента неподходящим для участия; и (17) Продолжающаяся сексуальная активность у мужчин или женщин с детородным потенциалом, которые не желают практиковать адекватную контрацепцию во время исследования.

Терапии в рамках исследования

[0261] mAb будут поставлены в виде жидкости в стерильных пузырьках одноразового использования. Каждый пузырек будет содержать объем, достаточный для забора 10 мл mAb при концентрации, равной 25 мг/мл. Инструкции по дозе препарата предоставлены в справочном руководстве по исследованию. mAb будут вводиться в амбулаторном учреждении в виде 30 минутной ВВ инфузии. Каждая доза для пациента будет зависеть от индивидуальной массы тела. Доза mAb должна регулироваться каждый цикл с учетом изменений массы тела $\geq 10\%$. mAb будут вводиться отдельно и в комбинации с облучением и/или циклофосфамидом.

Монотерапия

[0262] mAb будут вводиться в амбулаторном учреждении посредством ВВ инфузии в течение 30 минут каждые 14 дней в течение 48 недель (т.е., в Дни 1, 15 \pm 3, 29 \pm 3, и 43 \pm 3 56-дневного цикла). Планируемые режимы монотерапии для назначения могут включать: (i) ВВ инфузия 1 мг/кг в течение 30 минут каждые 14 дней в течение 48 недель; (ii) инфузия 3 мг/кг в течение 30 минут каждые 14 дней в течение 48 недель; (iii) инфузия 10 мг/кг в течение 30 минут каждые 14 дней в течение 48 недель; и (iv) инфузия 0,3 мг/кг в течение 30 минут каждые 14 дней в течение 48 недель (если определено, что MTD ниже 1 мг/кг).

Комбинированная терапия

[0263] Сопутствующие лучевая терапия и циклофосфамид будут применяться по назначению, и их применимость, доза, дозовые модификации, снижения или задержки, а также любые потенциальные АЕ, являющиеся результатом их применения, будут отслеживаться наряду с такими же действиями для mAb.

[0264] **Совместное введение mAb и облучения:** mAb будут вводиться посредством ВВ инфузии в течение 30 минут каждые 14 дней в течение 48 недель в комбинации с лучевой терапией от дня 8 до дня 12. Планируемые режимы комбинации mAb и лучевой терапии могут включать:

инфузия 1 мг/кг mAb в течение 30 минут каждые 14 дней в течение 48 недель плюс 30 Гр лучевой терапии (6 Гр × 5 раз/неделю; дается 1 неделю после первой дозы mAb, предпочтительно в последующие дни)

инфузия 1 мг/кг mAb в течение 30 минут каждые 14 дней в течение 48 недель плюс 27 Гр лучевой терапии (9 Гр × 3 раза/неделю; дается 1 неделю после первой дозы mAb, предпочтительно не в последующие дни)

инфузия 3 мг/кг mAb в течение 30 минут каждые 14 дней в течение 48 недель плюс 30 Гр лучевой терапии (6 Гр × 5 раз/неделю; дается 1 неделю после первой дозы mAb, предпочтительно в последующие дни)

инфузия 3 мг/кг mAb в течение 30 минут каждые 14 дней в течение 48 недель плюс 27 Гр лучевой терапии (9 Гр × 3 раза/неделю; дается 1 недел после первой дозы mAb, предпочтительно не в последующие дни)

[0265] Пациенты будут получать либо 30 Гр, даваемые в виде 5 фракций по 6 Гр, вводимых ежедневно, начиная с 1 недели после первой дозы mAb, или 27 Гр, даваемые в виде 3 фракций по 9 Гр, вводимых в каждый следующий день, начиная с 1 недели после первой дозы mAb. Повреждение, выбранное для облучения должно представлять собой повреждение, которое может быть безопасно облучено фокусным излучением при шадящем показателе повреждения (повреждений), и, для которого облучение при предусимотренных ограниченных, паллиативных дозах будет считаться подходящим с медицинской точки зрения. Целевая доза для пациента будет основана на назначении когорты и должна соответствовать требованиям к нормальной ткани, в соответствии со стандартной практикой облучения в онкологии. Лечение при установленном в протоколе режиме дозирования разрешается, только если имеет место соответствие критериям для нормальной ткани. Если нельзя достичь соответствия критериям для нормальной ткани, при двух режимах лучевой терапии, установленных в протоколе, пациент не может быть допущен для включения в когорту комбинированного с облучением лечения в данном исследовании.

[0266] **Совместное введение mAb и циклофосфамида:** mAb будут вводиться посредством ВВ инфузии в течение 30 минут каждые 14 дней (2 недели) в течение 48 недель в комбинации с 200 мг/м² циклофосфамида каждые 14 дней для всего 4 доз. Каждая из 4 доз циклофосфамида будет вводиться за 1 день перед каждой из первых 4 доз mAb (Дни 1, 14, 28 и 42 первого 56-дневного цикла).

[0267] Несмотря на то, что циклофосфамид успешно применялся сопутствующим образом вместе с другими лекарственными средствами, скорость метаболизма и лейкопеническая активность циклофосфамида, как сообщают, увеличиваются посредством постоянного введения высоких доз фенобарбитала. Лечение циклофосфамидом вызывает выраженное и усойчивое ингибирование холинэстеразной активности, таким образом, потенцируя эффект от сукцинилхолинхлорида. Планируемый режим комбинации mAb и циклофосфамида для назначения представляет собой:

200 мг/м² Циклофосфамида каждые 14 дней (дни 1, 14, 28, и 42 первого 56-дневного цикл) при всего 4 дозах плюс инфузия 3 мг/кг mAb в течение 30 минут каждые 14 дней в течение 48 недель (предоставленная доза монотерапии равна 3 мг/кг < MTD; если 3 мг/кг > MTD, доза будет равна 1 мг/кг).

[0268] **Совместное введение mAb, облучения и циклофосфамида:** планируемый режим комбинации mAb, облучения и циклофосфамида включает:

200 мг/м² циклофосфамида каждые 14 дней (Дни 1, 14, 28, и 42 первого 56 дневного цикла) при всего 4 дозах плюс 27 Гр лучевой терапии (9 Гр × 3 раза/неделю; даваемой 1 неделю после первой дозы mAb, предпочтительно не в последующие дни) или

30 Гр лучевой терапии (6 Гр × 5 раз/неделю; даваемой 1 неделю после первой дозы mAb, предпочтительно в последующие дни) плюс инфузия 3 мг/кг mAb в течение 30 минут каждые 14 дней в течение 48 недель (предоставленная доза монотерапии равна 3 мг/кг < MTD; если 3 мг/кг > MTD, доза будет равна 1 мг/кг)

Переменные исследования

[0269] **Первичные переменные:** Первичные переменные

безопасности включают появление DLT, появление и тяжесть неблагоприятных явлений, возникших на фоне лечения (TEAE), и аномальные результаты лабораторных анализов на протяжении 48 недель лечения.

[0270] Вторичные переменные: Ключевые вторичные переменные включают следующее: Концентрацию в сыворотке и фармакокинетику (ФК) mAb

Противоопухолевую активность оценивают с использованием соответствующих критериев для назначения: критерии оценки ответа при солидных опухолях, измеренные посредством компьютерной томографии (КТ) или магнитно-резонансной томографии (МРТ)

Другие критерии оценки также должны применяться для конкретных опухолей, для которых измерения по RECIST не являются стандартными.

Критерии оценки ответа, относящегося к иммунитету (irRC), применяемые к данным измерений по RECIST.

Во всех случаях, irRC будет направляющим инструментом для определения прогрессирования заболевания (PD), SD, CR или PR. Стандартные данные RECIST будут также собраны для информационных целей.

Антитела против mAb

Методики исследования

[0271] Следующие методики будут выполняться при скрининге с целью определения соответствия требованиям к исследованию или характеристики исходной популяции: (i) сывороточный β -НСГ (результат должен быть ≤ 72 часа до первой дозы); (ii) Сбор архивированного опухолевого материала: После подписания пациентом информированного согласия, пациенту будет предложено предоставить любые доступные ранее собранные опухолевые образцы; (iii) МРТ мозга: МРТ мозга требуется при скрининге, если не была проведена в течение предшествующих 60 дней; и (iv) Рентгенограмма грудной клетки: Рентгенограмма грудной клетки требуется при скрининге, если не была проведена в течение предшествующих 60 дней.

[0272] Методики оценки эффективности действия: КТ или МРТ для оценки опухоли будет выполняться при визите на скрининг (в интервале 28 дней перед инфузией) и во время каждого цикла (приблизительно каждые 8 недель) в День 56 ± 3 , и, когда предполагают прогрессирование заболевания. Дополнительно, для пациентов, у которых не было прогрессирования при исследовании, оценка опухоли будет выполняться в течение визитов 3, 5 и 7 последующего наблюдения. Как только сделан выбор применения сканирующей КТ или МРТ, последующие оценки будут проводиться с использованием такой же модальности.

[0273] Оценка опухолевого ответа будет выполняться в соответствии с критериями оценки относящегося к иммунитету ответа (irRC; Nishino 2013). Оценки в соответствии с критериями оценки ответа при солидных опухолях (RECIST) версия 1.1 (Eisenhauer 2009) также будет проводиться в качестве подтверждающего обследования; однако, первичное определение прогрессирования заболевания для индивидуального пациента будет сделано в соответствии с irRC. Измеряемые повреждения, выбранные в качестве целевых повреждений для оценок по RECIST, также будут включены как показатель повреждений для оценок согласно irRC.

[0274] Методики обеспечения безопасности: Будут собраны основные показатели состояния организма, включающие температуру, артериальное давление в состоянии покоя, пульс и дыхание. При планировании проведения в тот же визит, что и другие методики, измерение основных показателей состояния организма должно проводиться перед клиническими лабораторными оценками, ФК, или поисковым сбором образцов. Во время цикла 1, основные показатели состояния организма будут регистрироваться в Дни лечения, перед лечением, в конце инфузии, каждые 30 минут в течение первых 4 часов после инфузии, и при 6 и 8 часах после введения исследуемого лекарственного средства. При последующих циклах, основные показатели состояния организма в Дни лечения будут оцениваться и документироваться перед инфузией, каждые 30 минут в течение первых 2 часов, и затем ежечасно до 4 часов

после введения исследуемого лекарственного средства.

[0275] При визитах будет выполняться тщательный полный или ограниченный медицинский осмотр. Полный медицинский осмотр будет включать обследование кожи, головы, глаз, носа, горла, шеи, суставов, легких, сердца, пульса, брюшной полости (включая печень и селезенку), лимфатических узлов и конечностей, а также короткое неврологическое обследование. Ограниченный медицинский осмотр будет включать легкие, сердце, брюшную полость и кожу.

[0276] Будет выполняться стандартное ЭКГ в 12 отведениях. Любые результаты ЭКГ, которые по мнению исследователя представляют собой клинически значимое изменение (ухудшение) в сравнении с исходным значением, будут рассматриваться как АЕ, регистрироваться и наблюдаться.

[0277] Аналитические тесты на иммунологическую безопасность состоят из определения ревматоидного фактора (RF), тиреостимулирующего гормона (TSH), С-реактивного белка (CRP), и титра и распределения антиядерного антитела (ANA). Если во время прохождения исследования, наблюдают 4-кратное или более высокое увеличение от исходного уровня по RF или ANA или аномальные уровни TSH или CRP, могут также проводиться следующие тесты: на антитело против ДНК, антитело против антигена А синдрома Сегрена (SSA) (Ro), антитело против антигена В синдрома Сегрена (SSB) (La), антитело к тиреоглобулину, антитело против LKM, антитело против фосфолипида, антитело против островковых клеток, антитело против нейтрофилов C3, C4, CH50 в цитоплазме. Активированное частичное тромбопластиновое время (aPTT) и Международный коэффициент нормализации (INR) будут анализироваться местной лабораторией лечебного учреждения.

Безопасность

[0278] Неблагоприятное явление (АЕ) представляет собой любое нежелательное медицинское явление у пациента, которому введено исследуемое лекарственное средство, которое может иметь или не иметь причинно-следственную связь с исследуемым лекарственным средством. Следовательно, АЕ представляет собой неблагоприятный и нежелательный (включающий аномальный

лабораторный результат), симптом, или заболевание, которое временно ассоциировано с применением исследуемого лекарственным средством, независимо от того или считают ли их относящимися к исследуемому лекарственному средству. АЕ также включает любое ухудшение (т.е., любое клинически значимое изменение частоты и/или интенсивности) ранее существующего состояния, которое временно ассоциировано с применением исследуемого лекарственного средства. Прогрессирование основополагающего злокачественного новообразования не будет считаться АЕ, если оно явным является следствием типичной схемы прогрессирования основополагающего злокачественного новообразования (включая период действия, пораженные органы и т.д.). Клинические симптомы прогрессирования могут быть представлены в отчете как АЕ, если симптом не может быть определен как исключительно обусловленный прогрессированием основополагающего злокачественного новообразования, или не соответствует ожидаемой схеме прогрессирования для заболевания при исследовании.

[0279] Серьезное неблагоприятное явление (SAE) представляет собой любое нежелательное медицинское явление, которое при любой дозе приводит к смерти, представляет угрозу для жизни, требует госпитализации в стационаре или пролонгирования существующей госпитализации, приводит к устойчивой или значительной нетрудоспособности/недееспособности (существенному нарушению способности выполнять обычные жизненные функции), является врожденной аномалией/патологией родов.

[0280] Информация по всем АЕ и SAE у пациента будет регистрироваться.

План статистического анализа

[0281] Повышение исследуемой дозы основано на традиционном дизайне 3+3, с 3-6 пациентами, отнесенными к уровню дозы. Точное число пациентов, включенных в исследование, будет зависеть от числа наблюдаемых заданных протоколом DLT, и необходимости расширять заданные применяемые уровни доз, или открывать дополнительные когорты при более низких дозовых

уровнях. После требуемого начального включения в следующую когорту при наращивании дозы, включение в каждую из предыдущих когорт ниже MTD для такого лечения будет расширено (если ранее не расширяли во время наращивания) до всего 6 пациентов.

[0282] Данные будут обобщены с использованием только описательной статистики. В целом, данные будут обобщаться по дозовым уровням и комбинациям. Обобщения оценок безопасности и их анализы будут выполняться на основании выборки для анализа безопасности (SAF). Первичный анализ безопасности будет основан на нежелательных явлениях (AE), возникших на фоне лечения (TEAE).

[0283] Настоящее изобретение не будет ограничиваться по объему конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Несомненно, различные модификации изобретения в дополнение к модификациям, описанным здесь, будут понятны специалистам в данной области из предшествующего описания и сопровождающих чертежей. Такие модификации подразумевают как попадающие в пределы объема прилагаемой формулы изобретения.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Человеческие антитела к PD-1

<130> A0028W001

<140> To be assigned

<141> Filed herewith

<150> 61/930,576

<151> 2014-01-23

<150> 62/014,181

<151> 2014-06-19

<160> 337

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 363

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 1

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgttcag cctctggatt caccttttagc agctatacca tgaactgggt cgcagggt 120
ccaggaagg ggctggagt ggtctcaggt attagtgata ccgggtggtaa cacatactac 180
acagactccg tgaagggccg gttcacctgc tccagagaca attccaagaa cacactgtct 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcag 300
ggtggaagtt acccctatta ctttctactac tggggccagg gatccctggt caccgtctcc 360
tca 363

```

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 2

```

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

```

<210> 3
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 3
ggattcacct ttagcagcta tacc 24

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 4
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr
1 5

<210> 5
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 5
attagtgata ccggtggtaa caca 24

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 6
Ile Ser Asp Thr Gly Gly Asn Thr
1 5

<210> 7
<211> 42
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 7
gcgaaagatc aggggtggaag ttaccsctat tacttttcast ac 42

<210> 8
<211> 14
<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 8

Ala Lys Asp Gln Gly Gly Ser Tyr Pro Tyr Tyr Phe His Tyr
1 5 10

<210> 9

<211> 324

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 9

gacatccaga tgaccscagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cacagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa tttgggtatca gcagaaacca 120
gggacagccc ctaagttcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gctgtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 10

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 Ile Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ala Pro Lys Phe Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Cys 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 Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 11

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 11

caagcatta gcagctat

18

<210> 12

<211> 6

<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 12
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 13
gctgcatcc

9

<210> 14
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 14
Ala Ala Ser
1

<210> 15
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 15
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc

30

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 16
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 17
<211> 366
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 17
gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttgggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggggt caccgtcagc aacaactaca tgagctgggt cccgccaggct 120
ccaggaagc ggctggagtg ggtctcagtt atttatagcg gtgggtttcac atactacaca 180
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agacacaatt ccaagaacac gctgtatctt 240
caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgagag gtattactat 300
gatactagtg attattggac cttctttgac tactggggcc agggaacctt ggtcaccgctc 360
tcctca 366

<210> 18
<211> 122
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 18
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 Val Ser Asn Asn
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Phe Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Tyr Tyr Tyr Asp Thr Ser Asp Tyr Trp Thr Phe Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 19
gggttcaccg tcagtaacaа ctac 24

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 20
Gly Phe Thr Val Ser Asn Asn Tyr
1 5

<210> 21

<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 21
atztatagcg gtggtttcac a 21

<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 22
Ile Tyr Ser Gly Gly Phe Thr
1 5

<210> 23
<211> 48
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 23
gcgaggtatt acatgatgac tagtgattat tggacsttct ttgactac 48

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 24
Ala Arg Tyr Tyr Tyr Asp Thr Ser Asp Tyr Trp Thr Phe Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 25
<211> 321
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 25
gaaatagtga tgacgagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagtag cctgcagtct 240
ggagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa t 321

<210> 26

<211> 107
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 26
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80
Gly Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Asn
100 105

<210> 27
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 27
cagagtgtta gсagсаас

18

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 28
Gln Ser Val Ser Ser Asn
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 29
ggtgcatcc

9

<210> 30
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 30
Gly Ala Ser
1

<210> 31
<211> 27
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 31
cagcagtata ataactggcc gctcact

27

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 32
Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 33
<211> 366
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 33
gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttgggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggggt caccgtcagt aacaactaca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggagt ggtctcagtt atttatagcg gtggtttcac atactacaca 180
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agacacaatt ccaagaacac gctgtatctt 240
caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgogag gtattactat 300
gatactagtg attattggac cttctttgac tactggggcc agggaaacct ggtcaccgct 360
tcctca 366

<210> 34
<211> 122
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 34
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 Val Ser Asn Asn
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Phe Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Tyr Tyr Tyr Asp Thr Ser Asp Tyr Trp Thr Phe Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 35
gggttcaccg tcagtaacaa ctac

24

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 36
Gly Phe Thr Val Ser Asn Asn Tyr
1 5

<210> 37
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 37
atttatagcg gtggtttcac a

21

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 38
Ile Tyr Ser Gly Gly Phe Thr
1 5

<210> 39
<211> 48
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 39

gcgaggtatt actatgatac tagtgattat tggaccttct ttgactac

48

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 40

Ala Arg Tyr Tyr Tyr Asp Thr Ser Asp Tyr Trp Thr Phe Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 41

<211> 321

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 41

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtggttag agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120
ggccaggtc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagtag cctgcagtct 240
ggagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa t 321

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 42

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

<210> 43

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 43

cagagtgtta gcagсаас

18

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 44

Gln Ser Val Ser Ser Asn

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 45

ggtgсаtcc

9

<210> 46

<211> 3

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 46

Gly Ala Ser

1

<210> 47

<211> 27

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 47

cagсаgtata атаactggcc gctсаct

27

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 48
Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 49
<211> 357
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 49
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagt ctggggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa tatatactat 180
tcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagcca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagaccggga 300
cactggaact acttctttga atactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctctca 357

<210> 50
<211> 119
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 50
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Ser Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Ala Asn Ser Lys Asn Thr 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 Pro Gly His Trp Asn Tyr Phe Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 51
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 51
ggattcacct tcagtagcta tggc

24

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 52
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 53
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 53
atatggtatg atggaagtaa tata

24

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 54
Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Ile
1 5

<210> 55
<211> 36
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 55
gsgagaccgg gacactggaа ctacttcttt gaatac

36

<210> 56
<211> 12
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 56
Ala Arg Pro Gly His Trp Asn Tyr Phe Phe Glu Tyr
1 5 10

<210> 57
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 57
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattaac aactatntaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatact gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgct caccttcggc 300
caagggacac aactggagat taaa 324

<210> 58
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 58
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 Asn Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Thr 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 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
85 90 95
Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Gln Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 59
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 59
cagagcatta acaactat

18

<210> 60
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 60
Gln Ser Ile Asn Asn Tyr
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 61
actgcatcc

9

<210> 62
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 62
Thr Ala Ser
1

<210> 63
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 63
саасаgagtt асаgтасссс тссgтсасс

30

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 64
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Leu Thr
1 5 10

<210> 65
<211> 366
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 65
gaggтgсаgс тggтggagтс тgggggaggс тtggтacagс ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtggag cctctggatt caccttcagg aactacgaca tgcactgggt ccgccaaatt 120
acaggaaaag gtctggagtg ggtctcagct attggtagtg ctggtgacac atactatcca 180
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaagaactc cttgtatctt 240
caaatgaaca gcctgagagt cggggacacg gctgtgtatt actgtacaag agatatccat 300
tgtagtagta ccaggtgcta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360
tcctca 366

<210> 66
<211> 122
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 66

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

<210> 67

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 67

ggattcacct tcaggaacta cgac

24

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 68

Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr Asp
1 5

<210> 69

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 69

attggtagtg ctggtgacac a

21

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 70
Ile Gly Ser Ala Gly Asp Thr
1 5

<210> 71
<211> 48
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 71
acaagagata tccattgtag tagtaccagc tgctacggta tggacgtc 48

<210> 72
<211> 16
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 72
Thr Arg Asp Ile His Cys Ser Ser Thr Arg Cys Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 73
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 73
gacatccaga tgaccsagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtc gagcattagc aactatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 74
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 74
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 Asn 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	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Pro
				85					90					95	
Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

<210> 75
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 75
 sagagcatta gsaactat 18

<210> 76
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 76
 Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
 1 5

<210> 77
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 77
 gctgcatcc 9

<210> 78
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 78
 Ala Ala Ser
 1

<210> 79
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 79
 caacagagtt acagtacccc tccgatcacc 30

<210> 80
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 80
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 81
<211> 390
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 81
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtaaagc ctgggggggct ccttcgactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caaattcagt aatgaatgga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca aaactgatgg tgggacaaca 180
gactacgctg caccctgtaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaatacg 240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300
gatcaagatt tttggagtgg ttattatacc ggggctgact actacgggat ggacgtctgg 360
ggccaaggga ccatgggtcac cgtctcctca 390

<210> 82
<211> 130
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 82
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Asn Glu
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60
Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Thr Thr Asp Gln Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Thr Gly Ala
100 105 110
Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
115 120 125
Ser Ser
130

<210> 83
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 83

ggattcaaat tcagtaatga atgg

24

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 84

Gly Phe Lys Phe Ser Asn Glu Trp

1

5

<210> 85

<211> 30

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 85

attaaaaagca aaactgatgg tgggacaaca

30

<210> 86

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 86

Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr

1

5

10

<210> 87

<211> 63

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 87

accacagatc aagatTTTTg gAgTggttat tataccgggg ctgactacta cggtatggac 60

gtc

63

<210> 88

<211> 21

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 88

Thr Thr Asp Gln Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Thr Gly Ala Asp Tyr
1 5 10 15
Tyr Gly Met Asp Val
20

<210> 89

<211> 324

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 89

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cacagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 90

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 90

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 Ser Leu Gln Pro
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 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 91

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 91

cagagcatta gcagstat

18

<210> 92

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 92
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 93
gctgcatcc

9

<210> 94
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 94
Ala Ala Ser
1

<210> 95
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 95
саасаgagtt асаgтасссс тссgатсасс

30

<210> 96
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 96
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 97
<211> 348
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 97
cagatgcagc tccaacagtg gggcgcagga ctattgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcggtg tctatgggtg gtccctcaat ggatactatt ggagctggat cgcgccagtc 120
cccgggaagg ggctggagtg gattggggaa atcgatcata gtggaagcac caactacaac 180
ccgtccctca agaatcgagt caccatgtca gtagacacgt ctaagattca gttctccctg 240
aaactgacct ctgtgaccgt cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agaaggatta 300
ttaccctttg actattgggg ccaggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210> 98
<211> 116
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 98
Gln Met Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Val Val Tyr Gly Gly Ser Leu Asn Gly Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asp His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Asn Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Ile Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Thr Ser Val Thr Val Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Glu Gly Leu Leu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 99
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 99
ggtgggtccc tcaatggata ctat 24

<210> 100
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 100
Gly Gly Ser Leu Asn Gly Tyr Tyr
1 5

<210> 101
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 101
atcgatcata gtggaagcac c 21

<210> 102
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 102
Ile Asp His Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 103
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 103
gcgagagaag gattattacc ctttgactat 30

<210> 104
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 104
Ala Arg Glu Gly Leu Leu Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 105
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 105
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagtcacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtttac agcaactact tagcctggta ccagcagaat 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gctgcatcca acagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag sagactggag 240
cctgaagatt ttgcggtgta ttactgtcat cagtatgcta cctcaccttg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaat caaa 324

<210> 106
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 106
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Asn
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Asn Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ala Thr Ser Pro
85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 107
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 107
cagagtgttt acagcaacta c

21

<210> 108
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 108
Gln Ser Val Tyr Ser Asn Tyr
1 5

<210> 109
<211> 9
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 109
gctgcatcc

9

<210> 110
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 110

Ala Ala Ser

1

<210> 111

<211> 27

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 111

catcagtatg ctacstcacc ttggacg

27

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 112

His Gln Tyr Ala Thr Ser Pro Trp Thr

1

5

<210> 113

<211> 369

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 113

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagat ctgggtgaagc cttcggatac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgatga ctccatcagc agtactactt actactgggc ctggatccgc 120
cagcccccag ggaaggggct ggaatggatt ggcagtatgt cttataatgg gaacaactac 180
tacaaccsgt ccctcaagag tcgagtcgcc atatccgcag gcacgtccca gaaacagttc 240
tccctgaaac tgacstctgt gactgcccga gacacggctg tttatcactg tgcgagacat 300
cttgatata acggcaactg gtaccctttt gacttctggg gccaggggat tctggtcacc 360
gtctcctct 369

<210> 114

<211> 123

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 114

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

Ser	Leu	Lys	Leu	Thr	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	His
				85					90					95	
Cys	Ala	Arg	His	Leu	Gly	Tyr	Asn	Gly	Asn	Trp	Tyr	Pro	Phe	Asp	Phe
			100					105					110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Ile	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120								

<210> 115
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 115
 gatgactcca tcagcagtac tacttactac

30

<210> 116
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 116
 Asp Asp Ser Ile Ser Ser Thr Thr Tyr Tyr
 1 5 10

<210> 117
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 117
 atgtcttata atggaасаа с

21

<210> 118
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 118
 Met Ser Tyr Asn Gly Asn Asn
 1 5

<210> 119
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 119
gcgagacatc ttggatataa cggcaactgg taccctttg acttc

45

<210> 120
<211> 15
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 120
Ala Arg His Leu Gly Tyr Asn Gly Asn Trp Tyr Pro Phe Asp Phe
1 5 10 15

<210> 121
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 121
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccaggaga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagt agtagttatt tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcaggaccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccttg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaat caaa 324

<210> 122
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 122
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Thr Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 123
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 123
cagagtgtta gtagtagtta t 21

<210> 124
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 124
Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

<210> 125
<211> 9
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 125
ggtgcatcc 9

<210> 126
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 126
Gly Ala Ser
1

<210> 127
<211> 27
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 127
cagcagtatg gtagstcacc ttggacg 27

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 128
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 129
<211> 366
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 129
gaagtgcagg tggtagagtc tgggggcggc ttggctgagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtaaag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt ccgacaaact 120
ccagggaagg ccctggagtg ggtctcgggt attaattgga gtggtaataa cataggctat 180
gcggactctg tgaagggcscg attcaccatc tccaaggacg acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag acctgaggac acggccttat attactgtac aaaagatata 300
agtataactg gaaccctcga tgcttttgat gtctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360
tcttca 366

<210> 130
<211> 122
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 130
Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Asn Trp Ser Gly Asn Asn Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Lys Asp Ile Ser Ile Thr Gly Thr Leu Asp Ala Phe Asp Val Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 131
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 131
ggattcacct ttgatgatta tgcc

24

<210> 132
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 132
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
1 5

<210> 133
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 133
attaattgga gtggtataa cata 24

<210> 134
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 134
Ile Asn Trp Ser Gly Asn Asn Ile
1 5

<210> 135
<211> 45
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 135
acaaaagata taagtataac tggaaccctc gatgcttttg atgtc 45

<210> 136
<211> 15
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 136
Thr Lys Asp Ile Ser Ile Thr Gly Thr Leu Asp Ala Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 137
<211> 321
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 137
gacatccaga tgaccagtc tccaatttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca ggggtattagc aactggttag cctgggtatca gcagaaacca 120

gggatagccc ctaaactcct gatctattct gcatccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagag gcagtgatc tgggacagac ttcactctca ccatcggcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctcacagtt tcccgcctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 138

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 138

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

<210> 139

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 139

caggtatta gsaactgg

18

<210> 140

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 140

Gln Gly Ile Ser Asn Trp
1 5

<210> 141

<211> 9

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 141

tctgcatcc

9

<210> 142
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 142
Ser Ala Ser
1

<210> 143
<211> 27
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 143
саасаggctc асаgtttccc gctcact

27

<210> 144
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 144
Gln Gln Ala His Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 145
<211> 348
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 145
cagggtgсаat tagtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctgggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgсag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgсcaggct 120
ссaggсаagg ggctggagtg ggtggсаatt atatgggtctg atggagatag tгаatатаat 180
ctagactccg тааaggгссg attcaccatc tccagagaca attccaаgаа cacgctgtat 240
ctgсааatga асаgtctgag agtcгаagac tcggctgtat attactgtgc гагагаtоса 300
gaccttgagg atatctgggg cсаaggггаса atggtcaccg tctcttca 348

<210> 146
<211> 116
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 146
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

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

<210> 147
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 147
 ggattcacct tcagtagcta tggc

24

<210> 148
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 148
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 149
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 149
 atatggtctg atggagatag tga

24

<210> 150
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 150
 Ile Trp Ser Asp Gly Asp Ser Glu
 1 5

<210> 151
<211> 27
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 151
gcgagagatc gagaccttga ggatatc

27

<210> 152
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 152
Ala Arg Asp Arg Asp Leu Glu Asp Ile
1 5

<210> 153
<211> 321
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 153
gacatccaga tgaccsagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccaatt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtgatc tgggacagag ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt atccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 154
<211> 107
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 154
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 Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 155
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 155
cagggcatta gaaatgat

18

<210> 156
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 156
Gln Gly Ile Arg Asn Asp
1 5

<210> 157
<211> 9
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 157
gctgcatcc

9

<210> 158
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 158
Ala Ala Ser
1

<210> 159
<211> 27
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 159
ctacagcata atagttatcc gtcact

27

<210> 160
<211> 9
<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 160

Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 161

<211> 351

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 161

gaggtgcagt tgttggagtc tgggggagtt ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt aatthtggca tgacgtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gactggagtg ggtctcaggt attagtgggt gcggtcgtga cacatacttc 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa tacgttgtat 240
ctacagatga acagcctgaa aggcgaggac acggccgtat attactgtgt gaagtgggga 300
aatatttact ttgactactg gggccagga accctgggtca ccgtctcatc a 351

<210> 162

<211> 117

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 162

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

<210> 163

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 163

ggattcacct ttagtaattt tggc

<210> 164
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 164
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Gly
1 5

<210> 165
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 165
attagtggtg gcggtcgtga caca

24

<210> 166
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 166
Ile Ser Gly Gly Arg Asp Thr
1 5

<210> 167
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 167
gtgaagtggg gaaatattta ctttgactac

30

<210> 168
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 168
Val Lys Trp Gly Asn Ile Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 169
<211> 321
<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 169

```
gacatccaga tgaccsagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga cagcatcacc 60
atcacttgcc gggcgagtct gtccattaac acctttttaa attgggatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct gcgtccagtt tacatgggtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagcggctc tgggacagat ttcactctca ccatcagaac tcttcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttccaata cccattcac tttcggccct 300
gggaccgtag tggatttcag a 321
```

<210> 170

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 170

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

<210> 171

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 171

ctgtccatta acacsttt

18

<210> 172

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 172

```
Leu Ser Ile Asn Thr Phe
 1           5
```

<210> 173

<211> 9

<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 173
gctgctcc

9

<210> 174
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 174
Ala Ala Ser
1

<210> 175
<211> 27
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 175
саасаgagtt ссаатасссс аттсаст

27

<210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 176
Gln Gln Ser Ser Asn Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 177
<211> 363
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 177
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggagga gtggtacggc cggggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgacg cctctggatt cacttttgat gactatggca tgagttgggt ccgccaagtt 120
сsaggaaggg ggctggagtg ggtctcaggt attagttgga atgatggtaa gacagtttat 180
gsagagtctg tgaagggscg attcatcatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctggaaatga atagtctgag agccgaggac acggccttat attactgtgc gagagattgg 300
cagtacttga tagagcggta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 178

<211> 121
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 178
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Trp Asn Asp Gly Lys Thr Val Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Trp Gln Tyr Leu Ile Glu Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 179
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 179
ggattcactt ttgatgacta tggc

24

<210> 180
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 180
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly
1 5

<210> 181
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 181
attagttgga atgatggtaa gaca

24

<210> 182
<211> 8
<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 182

Ile Ser Trp Asn Asp Gly Lys Thr
1 5

<210> 183

<211> 42

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 183

gcgagagatt ggcagtactt gatagagcgg tactttgact ac 42

<210> 184

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 184

Ala Arg Asp Trp Gln Tyr Leu Ile Glu Arg Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 185

<211> 324

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 185

gaaatagttt tgacacagag tcccggcaca ctgtcactct ctcccgggga aagagccacc 60
ttgtcatgta gagcaagtca gtcagtctct agctcttata tcgcctggta ccagcagaag 120
ccgggacagg cccctagact gctgatctac ggggcaagtt ccagggccac cggaatcccc 180
gaccggttca gtggaagcgg aagcggaaacc gattttactt tgacgatttc tagactggag 240
ccagaggatt tcgscgttta ctattgtcaa cagtacggaa gcagcccgtg gacgtttggc 300
cagggcacga aggtagaat caag 324

<210> 186

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 186

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

		35						40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	
	50					55					60					
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	
65					70					75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro	
				85					90					95		
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
			100					105								

<210> 187
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 187
 cagtcagtct ctagctctta t 21

<210> 188
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 188
 Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 189
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 189
 ggggsaagt 9

<210> 190
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 190
 Gly Ala Ser
 1

<210> 191
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 191
саасаgтасg гааgсаgссс gтgгасg

27

<210> 192
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 192
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 193
<211> 363
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 193
gaggтgсаgс tggтgggаgтс tggggggаgгt gtggтacggс ctgggggggтс сctgаgаctс 60
tcctgtacag cctctggatt cacctttgat gattatggca tgagctgggt ccgccaagct 120
ccaggaagg ggctggagt gatctctggt attggttgga ctggтggтсg gtcaagttat 180
gcagactctg tgaggggссg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ttccctgtat 240
ctgсааатга асаgtctggg агссgaggac acggсcttgt attattgtgc ааgаgаtсgg 300
саgtggctgg tgcagtggta ctttgactac tggggccagg гаaccctggт caccgtctcc 360
tca 363

<210> 194
<211> 121
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 194
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ser Gly Ile Gly Trp Thr Gly Gly Arg Ser Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Arg 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 Gly Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Arg Gln Trp Leu Val Gln Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 195

<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 195
ggattcacct ttgatgatta tggc

24

<210> 196
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 196
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly
1 5

<210> 197
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 197
attggttggc ctggtggtcg gtca

24

<210> 198
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 198
Ile Gly Trp Thr Gly Gly Arg Ser
1 5

<210> 199
<211> 42
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 199
gsaagagatc ggcagtggct ggtgcagtgg tactttgact ac

42

<210> 200
<211> 14
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 200

Ala Arg Asp Arg Gln Trp Leu Val Gln Trp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 201

<211> 324

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 201

gacatccaga tgaccscagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cacagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 202

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 202

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 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 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 203

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 203

cagagcatta gcagstat

18

<210> 204

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 204
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 205
<211> 9
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 205
gctgcatcc

9

<210> 206
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 206
Ala Ala Ser
1

<210> 207
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 207
саасаgagtt асаgтасссс тссgатсасс

30

<210> 208
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 208
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 209
<211> 363
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 209
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaaga gtggtacggc cggggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacttttgat gactatggca tgagttgggt ccgccaactt 120
ccaggggaagg gcctggagtg ggtcgcaggt attagttgga atgatggtaa gacagtttat 180
gcagagtctg tgaagggccg attcatcatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgcat 240
ctggagatga acagtctgag agccgaggac acggccttat attactgtgc gcgagattgg 300
caatacttaa tagatcgta ctttgacttc tgggggtcagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 210
<211> 121
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

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

<210> 211
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 211
ggattcactt ttgatgacta tggc 24

<210> 212
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 212
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly
1 5

<210> 213
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 213
attagttgga atgatggtaa gaca 24

<210> 214
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 214
Ile Ser Trp Asn Asp Gly Lys Thr
1 5

<210> 215
<211> 42
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 215
gcgcgagatt ggcaatactt aatagatcgt tacttttgact tc 42

<210> 216
<211> 14
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 216
Ala Arg Asp Trp Gln Tyr Leu Ile Asp Arg Tyr Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 217
<211> 363
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 217
gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggcgggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcc a tgcactgggt ccggcaagct 120
ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attggttgga gtagtggttag cataggctat 180
gcggactctg tgaagggcsg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcccttgat 240
ctgcaaatgg acagtctgag acctgaggac tcagccttat attactgtgc aaaagcctat 300
acatttatga ttaccctcta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 218
<211> 121
<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 218

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 Asp Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Gly Trp Ser Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala 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 Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Ala Tyr Thr Phe Met Ile Thr Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 219

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 219

ggattcacct ttgatgatta tgcc

24

<210> 220

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 220

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
1 5

<210> 221

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 221

attggttga gtagtgtag cata

24

<210> 222

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 222
Ile Gly Trp Ser Ser Gly Ser Ile
1 5

<210> 223
<211> 42
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 223
gcaaaagcct atacatztat gattaccctc tacttttgact ac 42

<210> 224
<211> 14
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 224
Ala Lys Ala Tyr Thr Phe Met Ile Thr Leu Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 225
<211> 363
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 225
gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgaca tgcactgggt ccggcaagct 120
ccaggaagg gcctggagtg ggtgtcaggg agtggttgga ataggggtag tttaggctat 180
gcggttctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa gtccctgtat 240
ctgcaaatga acagtgtgag agttgaggac acggccttgt attactgtgc aaaaggcttt 300
gtagtggat cagctgctta ctttgactac tggggccagg gaaccctggc caccgtctcc 360
tca 363

<210> 226
<211> 121
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 226
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ser Gly Trp Asn Arg Gly Ser Leu Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Val Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Phe Val Val Val Ser Ala Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 227
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 227
ggattcacct ttgatgatta tgac

24

<210> 228
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 228
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Asp
1 5

<210> 229
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 229
agtggttgga ataggggtag tttta

24

<210> 230
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 230
Ser Gly Trp Asn Arg Gly Ser Leu
1 5

<210> 231
<211> 42
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 231

gcaaaaggct ttgtagtggt atcagctgct tactttgact ac

42

<210> 232

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 232

Ala Lys Gly Phe Val Val Val Ser Ala Ala Tyr Phe Asp Tyr

1

5

10

<210> 233

<211> 363

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 233

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagagggc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg tatctggagt caccttcagg aattttgcta tcatctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagt gatgggagga atcatccctt tctttagtgc agcaaattac 180
gcacagagct tccagggcag agtcacgatt accccggacg aatccacgag cacagccttc 240
atggagctgg ccagtctgag atctgaggac acggccgttt attattgtgc gagagagggg 300
gaacgtggac acacctatgg gtttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 234

<211> 121

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 234

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

<210> 235
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 235
ggagtcacct tcaggaattt tgct

24

<210> 236
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 236
Gly Val Thr Phe Arg Asn Phe Ala
1 5

<210> 237
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 237
atcatccctt tctttagtgc agca

24

<210> 238
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 238
Ile Ile Pro Phe Phe Ser Ala Ala
1 5

<210> 239
<211> 42
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 239
gcgagagagg gggaacgtgg acacacstat gggtttgact ac

42

<210> 240
<211> 14
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 240
Ala Arg Glu Gly Glu Arg Gly His Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 241
<211> 363
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 241
gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagt ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgccca tgcactgggt ccgacaacct 120
ccaggaagg gcctggaatg ggtctcaggt attaactgga atagaggtag gacaggctat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acgatctgag agttgaggat acggccttgt attactgtgc aaaagccgaa 300
cagtggtctgg acgagggata ctttgactac tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc 360
tca 363

<210> 242
<211> 121
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 242
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Asn Trp Asn Arg Gly Arg Thr Gly Tyr Ala 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 Asp Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Ala Glu Gln Trp Leu Asp Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 243
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 243
ggattcacct ttgatgatta tgcc

<210> 244

<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 244
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
1 5

<210> 245
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 245
attaactgga atagaggtag gaca 24

<210> 246
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 246
Ile Asn Trp Asn Arg Gly Arg Thr
1 5

<210> 247
<211> 42
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 247
gcaaaagccg aacagtggct ggacgagggg tacttttgact ac 42

<210> 248
<211> 14
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 248
Ala Lys Ala Glu Gln Trp Leu Asp Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 249
<211> 363
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 249

```
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtgcagc gggggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cagcttttagc agctatgccca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcaact attagtgata gtgggtggtag tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatt tccagagaca attccaagaa cacgctgtct 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcag 300
ggtgggagtt acccctacta ctttctactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363
```

<210> 250

<211> 121

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 250

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

<210> 251

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 251

ggattcagct ttagcagcta tgcc

24

<210> 252

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 252

```
Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr Ala
 1          5
```

<210> 253
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 253
attagtgata gtggtggtag taca

24

<210> 254
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 254
Ile Ser Asp Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 255
<211> 42
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 255
gcgaaagatc aggggtgggag ttaccsctac tacttttcast ac

42

<210> 256
<211> 14
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 256
Ala Lys Asp Gln Gly Gly Ser Tyr Pro Tyr Tyr Phe His Tyr
1 5 10

<210> 257
<211> 363
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 257
gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgag gattatgccca tgcactgggt ccggcaagct 120
ccagggaaagg gcctggagtg ggtctcagggt attggttgga gtaatgtaaa gataggctat 180
gcggaactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgtcaggaa ctccctatat 240
ctgcaaatga acagtctgag aactgaggac acggccttct attactgtgt aaaagcctat 300
acatctatgc ttaccctcta ctttgactat tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 258
<211> 121
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 258
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Glu Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Gly Trp Ser Asn Val Lys Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Arg Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Lys Ala Tyr Thr Ser Met Leu Thr Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 259
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 259
ggattcacct ttgaggatta tgcc

24

<210> 260
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 260
Gly Phe Thr Phe Glu Asp Tyr Ala
1 5

<210> 261
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 261
attggttgga gtaatgtaaa gata

24

<210> 262

<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 262
Ile Gly Trp Ser Asn Val Lys Ile
1 5

<210> 263
<211> 42
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 263
gtaaaagcct atacatctat gcttaccctc tactttgact at 42

<210> 264
<211> 14
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 264
Val Lys Ala Tyr Thr Ser Met Leu Thr Leu Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 265
<211> 354
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 265
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaggc ctggggcctc agtgaagggt 60
tcctgcaagg catctggata caccttcacc agcttctata tgtactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaata atcaacccta gtgatggtag cacaaagcaac 180
gsacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag tacagtctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagacgggtg 300
gctggggata tttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ttca 354

<210> 266
<211> 118
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 266
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe

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

<210> 267
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 267
 ggatacacct tcaccagctt ctat

24

<210> 268
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 268
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe Tyr
 1 5

<210> 269
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 269
 atcaacssta gtgatgtag casa

24

<210> 270
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 270
 Ile Asn Pro Ser Asp Gly Ser Thr
 1 5

<210> 271

<211> 33
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 271
gcgagacggg tggctgggga tatttttgat atc

33

<210> 272
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 272
Ala Arg Arg Val Ala Gly Asp Ile Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 273
<211> 357
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 273
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctgggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtgg ctccatcagt agttaccact ggaactggat ccggcagagt 120
ccaggaagg gactggaatg gattggatat atctattata ttgggagcac cgactataat 180
ccctccctcg agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag agtccccgtg 300
ggagctacag gggcttctga tgtctggggc caagggacaa tggtcaccgt ctcttca 357

<210> 274
<211> 119
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 274
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
His Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ile Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Glu
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Val Pro Val Gly Ala Thr Gly Ala Ser Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 275
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 275
ggtggctcca tcagtagtta ccac

24

<210> 276
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 276
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr His
1 5

<210> 277
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 277
atctattata ttgggagcac c

21

<210> 278
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 278
Ile Tyr Tyr Ile Gly Ser Thr
1 5

<210> 279
<211> 39
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 279
gscagagtcc ccgtgggagc tacaggggct tctgatgtc

39

<210> 280
<211> 13
<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 280

Ala Arg Val Pro Val Gly Ala Thr Gly Ala Ser Asp Val
1 5 10

<210> 281

<211> 363

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 281

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaagt gtggttcgac ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgtag tctctggatt cacctttgag gattatgggt tgagctgggt ccgccaat 120
ccagggaaag gactggagtg ggtctctggt attagttgga ctgggtggtaa cacaggttat 180
gcagactctg tgaagggccg cttcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agccgaagac acggccctgt atcactgtac gagagatcga 300
cagtggctga tgcagtggta ttttgactat tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 282

<211> 121

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 282

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

<210> 283

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 283

ggattcacct ttgaggatta tgggt

<210> 284
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 284
Gly Phe Thr Phe Glu Asp Tyr Gly
1 5

<210> 285
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 285
attagttgga ctggtggtaa caca

24

<210> 286
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 286
Ile Ser Trp Thr Gly Gly Asn Thr
1 5

<210> 287
<211> 42
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 287
acgagagatc gacagtggct gatgcagtgg tatttttgact at

42

<210> 288
<211> 14
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 288
Thr Arg Asp Arg Gln Trp Leu Met Gln Trp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 289
<211> 357

<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 289
cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
tcctgttcag cctctggatt caccttcagt gcctatgccca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggaatg ggtggcagct atctcatatg gtggaagtga taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgag aactgacgac acggctgtgt attactgtgc gaaatccgct 300
cactggaact tcttctttga ctactggggc caggggaacc tgggtcactgt ctctctca 357

<210> 290
<211> 119
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 290
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ala Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala 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
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Ser Ala His Trp Asn Phe Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 291
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 291
ggattcacct tcagtgccsta tgcc 24

<210> 292
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 292
Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr Ala
1 5

<210> 293
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 293
atctcatatg gtggaagtga taaa 24

<210> 294
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 294
Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asp Lys
1 5

<210> 295
<211> 36
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 295
gsgaaatccg ctcaactgga cttcttcttt gactac 36

<210> 296
<211> 12
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 296
Ala Lys Ser Ala His Trp Asn Phe Phe Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 297
<211> 363
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 297
gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgtag cctctggatt cgcccttcat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagtt 120
ccaggaagg gcctggagtg ggtctcaagt attagttgga atagtgggtg cataggctat 180
gcggaactctc tgaagggccg cttcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agcagaggac acggccttat actactgtgc aaaaggtagt 300
gggagctact acgtcagttg gttcgacccc tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc 360

<210> 298
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 298
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ala Leu His Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Trp Asn Ser Gly Val Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Leu
 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 Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Val Ser Trp Phe Asp Pro Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 299
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 299
 ggattcgccc ttcattgatta tgcc

24

<210> 300
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 300
 Gly Phe Ala Leu His Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 301
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 301
 attagttgga atagtgggtgt cata

24

<210> 302
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 302
Ile Ser Trp Asn Ser Gly Val Ile
1 5

<210> 303
<211> 42
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 303
gcaaaaggta gtgggagcta ctacgtcagt tggttcgacc cc 42

<210> 304
<211> 14
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 304
Ala Lys Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Val Ser Trp Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 305
<211> 369
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 305
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggttcagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcaactg tctctggtga ctccatcagt agtactgctt accactggga ctggatccgc 120
cagccccccg ggaagggact ggagtggatt gggaccatca cttataatgg gaacacctac 180
ttcaaccsgt ccstcaagag tcgagtcacc atatccggtg acacgtccaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tactctctat gaccgcccga gaaacggctg ttttttactg tgcgcgacat 300
ctaggatata acagtgactt ctttccctt gacttctggg gccagggaac cctgggtcact 360
gtctcctca 369

<210> 306
<211> 123
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 306
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Glu

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

<210> 307
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 307
 ggtgactcca tcagtagtac tgcttaccac

30

<210> 308
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 308
 Gly Asp Ser Ile Ser Ser Thr Ala Tyr His
 1 5 10

<210> 309
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 309
 atcacttata atgggaacac c

21

<210> 310
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 310
 Ile Thr Tyr Asn Gly Asn Thr
 1 5

<210> 311
<211> 45
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 311
gcgcgacatc taggatataa cagtgacttc tttccctttg acttc 45

<210> 312
<211> 15
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 312
Ala Arg His Leu Gly Tyr Asn Ser Asp Phe Phe Pro Phe Asp Phe
1 5 10 15

<210> 313
<211> 357
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 313
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctggtacggc cggggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc acctatgcca tggcctgggt ccgccagact 120
ccaggaagg ggctggaggg ggtctcagct attgggggta gtgggtgatag tacctattat 180
gtcgactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagggaca actccaagag cacgcttttt 240
ctgcaaatga atagcctgag agccgaggac acggccggtt attactgtgt gaaagtccgg 300
aattacgacg gttcttttga tatctggggc caagggacaa tggtcaccgt ctcttca 357

<210> 314
<211> 119
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 314
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Gly Val
35 40 45
Ser Ala Ile Gly Gly Ser Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Lys Val Arg Asn Tyr Asp Gly Ser Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 315
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 315
ggattcacct ttagcaccta tgcc 24

<210> 316
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 316
Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala
1 5

<210> 317
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 317
attgggggta gtggtgatag tacc 24

<210> 318
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 318
Ile Gly Gly Ser Gly Asp Ser Thr
1 5

<210> 319
<211> 36
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 319
gtgaaagtcc ggaattacga cggttctttt gatatc 36

<210> 320

<211> 12
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая

<400> 320
Val Lys Val Arg Asn Tyr Asp Gly Ser Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 321
<211> 174
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> hPD-1-MMH

<220>
<223> 1-146: aa 25-170 из NP_005009.2 с C93S

<220>
<223> 147-174: мус-мус-гексагистидин

<400> 321
Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala
1 5 10 15
Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe
20 25 30
Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro
35 40 45
Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln
50 55 60
Pro Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg
65 70 75 80
Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr
85 90 95
Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu
100 105 110
Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro
115 120 125
Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr
130 135 140
Leu Val Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln
145 150 155 160
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
165 170

<210> 322
<211> 174
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> MfPD-1-MMH

<220>
<223> 1-146: M.fascicularis PD-1 with C93S

<220>
<223> 147-174: мус-мус-гексагистидин

<400> 322

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

<210> 323

<211> 379

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> hPD-1-mFc

<220>

<223> 1-146: aa 25-170 из NP-005009.2 с C93S

<220>

<223> 147-379: mFc: aa 98-330 из P01863

<400> 323

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

Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser
		180													
Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His
		195					200						205		
Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile
					230							235			240
Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn
				245					250					255	
Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys
			260					265						270	
Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu
			275				280						285		
Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe
		290				295					300				
Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu
					310					315					320
Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr
				325					330					335	
Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg
				340				345					350		
Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His
		355					360					365			
Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Lys					
		370				375									

<210> 324

<211> 373

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> hPD-1-hFc

<220>

<223> 1-146: aa 25-170 из NP_005009.2 с C93S

<220>

<223> 147-373: hFc: aa 104-330 из P01857

<400> 324

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

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 180 185 190
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 195 200 205
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 210 215 220
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 225 230 235 240
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 245 250 255
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 260 265 270
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 275 280 285
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 290 295 300
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 305 310 315 320
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 325 330 335
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 340 345 350
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 355 360 365
 Leu Ser Pro Gly Lys
 370

<210> 325
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> hPD-L1-hFc

<220>
 <223> 1-221: aa 19-239 из NP_054862.1

<220>
 <223> 222-448: hFc: aa 104-330 из P01857

<400> 325
 Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
 1 5 10 15
 Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
 20 25 30
 Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
 35 40 45
 Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
 50 55 60
 Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
 85 90 95
 Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
 100 105 110
 Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
 115 120 125
 Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
 130 135 140
 Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
 145 150 155 160
 Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr

				165					170					175			
Ser	Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Thr	Thr	Thr	Asn	Glu	Ile	Phe	Tyr	Cys	Thr		
			180					185					190				
Phe	Arg	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	His	Thr	Ala	Glu	Leu	Val	Ile		
		195					200					205					
Pro	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	His	Pro	Pro	Asn	Glu	Arg	Thr	Asp	Lys	Thr		
	210					215					220						
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser		
225					230					235					240		
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg		
				245					250					255			
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro		
			260					265					270				
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala		
		275				280						285					
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val		
	290					295				300							
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr		
305					310					315					320		
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr		
				325					330					335			
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu		
			340					345					350				
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys		
		355					360					365					
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser		
	370					375					380						
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp		
385					390					395				400			
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser		
				405				410					415				
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala		
			420				425					430					
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
		435					440					445					

<210> 326

<211> 454

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> hPD-L1-mFc

<220>

<223> 1-221: aa 19-239 из NP_054862.1

<220>

<223> 222-454: mFc: aa 98-330 из P01863

<400> 326

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

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
 100 105 110
 Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
 115 120 125
 Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
 130 135 140
 Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
 145 150 155 160
 Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
 165 170 175
 Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
 180 185 190
 Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
 195 200 205
 Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr Glu Pro Arg
 210 215 220
 Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp
 245 250 255
 Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn
 275 280 285
 Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys
 355 360 365
 Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile
 370 375 380
 Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn
 385 390 395 400
 Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe
 435 440 445
 Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 450

<210> 327

<211> 288

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> hPD-1 NP_005009.2

<400> 327

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
 1 5 10 15
 Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
 20 25 30
 Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
 35 40 45
 Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val

50						55					60					
Leu	Asn	Trp	Tyr	Arg	Met	Ser	Pro	Ser	Asn	Gln	Thr	Asp	Lys	Leu	Ala	
65					70					75					80	
Ala	Phe	Pro	Glu	Asp	Arg	Ser	Gln	Pro	Gly	Gln	Asp	Cys	Arg	Phe	Arg	
				85					90					95		
Val	Thr	Gln	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Asp	Phe	His	Met	Ser	Val	Val	Arg	
			100					105					110			
Ala	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu	
		115					120					125				
Ala	Pro	Lys	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Arg	Val	
	130					135					140					
Thr	Glu	Arg	Arg	Ala	Glu	Val	Pro	Thr	Ala	His	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro	
145					150					155					160	
Arg	Pro	Ala	Gly	Gln	Phe	Gln	Thr	Leu	Val	Val	Gly	Val	Val	Gly	Gly	
				165					170					175		
Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Val	Leu	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ala	Val	Ile	Cys	
			180					185					190			
Ser	Arg	Ala	Ala	Arg	Gly	Thr	Ile	Gly	Ala	Arg	Arg	Thr	Gly	Gln	Pro	
		195				200						205				
Leu	Lys	Glu	Asp	Pro	Ser	Ala	Val	Pro	Val	Phe	Ser	Val	Asp	Tyr	Gly	
	210					215					220					
Glu	Leu	Asp	Phe	Gln	Trp	Arg	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Pro	Pro	Val	Pro	
225					230					235					240	
Cys	Val	Pro	Glu	Gln	Thr	Glu	Tyr	Ala	Thr	Ile	Val	Phe	Pro	Ser	Gly	
				245					250					255		
Met	Gly	Thr	Ser	Ser	Pro	Ala	Arg	Arg	Gly	Ser	Ala	Asp	Gly	Pro	Arg	
			260					265					270			
Ser	Ala	Gln	Pro	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Gly	His	Cys	Ser	Trp	Pro	Leu	
		275					280						285			

<210> 328

<211> 290

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> hPD-L1 NP_054862.1

<400> 328

Met	Arg	Ile	Phe	Ala	Val	Phe	Ile	Phe	Met	Thr	Tyr	Trp	His	Leu	Leu	
1				5					10					15		
Asn	Ala	Phe	Thr	Val	Thr	Val	Pro	Lys	Asp	Leu	Tyr	Val	Val	Glu	Tyr	
			20					25					30			
Gly	Ser	Asn	Met	Thr	Ile	Glu	Cys	Lys	Phe	Pro	Val	Glu	Lys	Gln	Leu	
		35				40						45				
Asp	Leu	Ala	Ala	Leu	Ile	Val	Tyr	Trp	Glu	Met	Glu	Asp	Lys	Asn	Ile	
	50				55						60					
Ile	Gln	Phe	Val	His	Gly	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Val	Gln	His	Ser	Ser	
65					70					75					80	
Tyr	Arg	Gln	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu	Lys	Asp	Gln	Leu	Ser	Leu	Gly	Asn	
				85					90					95		
Ala	Ala	Leu	Gln	Ile	Thr	Asp	Val	Lys	Leu	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr	
			100					105					110			
Arg	Cys	Met	Ile	Ser	Tyr	Gly	Gly	Ala	Asp	Tyr	Lys	Arg	Ile	Thr	Val	
		115				120						125				
Lys	Val	Asn	Ala	Pro	Tyr	Asn	Lys	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Leu	Val	Val	
	130					135				140						
Asp	Pro	Val	Thr	Ser	Glu	His	Glu	Leu	Thr	Cys	Gln	Ala	Glu	Gly	Tyr	
145					150					155					160	
Pro	Lys	Ala	Glu	Val	Ile	Trp	Thr	Ser	Ser	Asp	His	Gln	Val	Leu	Ser	
				165					170					175		
Gly	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Ser	Lys	Arg	Glu	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	
			180					185					190			

Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu
 305 310 315 320
 Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr
 325 330 335
 Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg
 340 345 350
 Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His
 355 360 365
 Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 370 375

<210> 330

<211> 444

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> H4H7798N

aa1-117: HCVR

aa118-444: HC константная

<400> 330

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

				325					330					335					
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln				
				340					345					350					
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly				
		355					360						365						
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro				
	370					375						380							
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser				
385					390					395					400				
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu				
				405					410					415					
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His				
			420					425						430					
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys								
		435					440												

<210> 331

<211> 214

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> H4H7798N

aa1-107: LCVR

aa108-214: LC константная

<400> 331

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly				
1				5					10					15					
Asp	Ser	Ile	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Leu	Ser	Ile	Asn	Thr	Phe				
			20					25					30						
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Ile				
		35					40					45							
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	His	Gly	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly				
	50					55					60								
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Arg	Thr	Leu	Gln	Pro				
65					70					75					80				
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Ser	Asn	Thr	Pro	Phe				
				85						90					95				
Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Val	Val	Asp	Phe	Arg	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				
						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> 332

<211> 449

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> H4H7795N2
aa1-122: HCVR
aa123-449: HC константная

<400> 332

Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Trp Ser Gly Asn Asn Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Lys Asp Ile Ser Ile Thr Gly Thr Leu Asp Ala Phe Asp Val Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
210 215 220
Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445
Lys

<210> 333
<211> 214
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> H4H7795N2
aa1-107: LCVR
aa108-214: LC константная

<400> 333
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ile Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ile Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Gly Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Phe Pro Leu
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> 334
<211> 446
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> H4H9008P
aa1-119: HCVR
aa120-446: HC константная

<400> 334
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Gly Val
35 40 45
Ser Ala Ile Gly Gly Ser Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

				85				90					95			
Val	Lys	Val	Arg	Asn	Tyr	Asp	Gly	Ser	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	
			100					105					110			
Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
		115					120					125				
Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	
	130					135					140					
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
145					150						155				160	
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
				165						170				175		
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
			180					185					190			
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	
		195				200						205				
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	
	210					215						220				
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
225					230					235					240	
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
				245					250					255		
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
			260					265					270			
Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
		275					280					285				
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	
	290					295						300				
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	
305					310					315					320	
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	
				325				330						335		
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	
			340					345					350			
Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	
		355					360						365			
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	
	370					375						380				
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	
385					390					395					400	
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	
				405					410					415		
Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	
			420					425					430			
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys			
		435					440					445				

<210> 335

<211> 215

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> H4H9008P

aa1-108: LCVR

aa109-215: LC константная

<400> 335

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
1				5					10					15		
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	
			20					25					30			
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	
		35					40						45			

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 336

<211> 448

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> H4H9048P2

aa1-121: HCVR

aa122-448: HC константная

<400> 336

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Val Thr Phe Arg Asn Phe
 20 25 30
 Ala Ile Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Phe Phe Ser Ala Ala Asn Tyr Ala Gln Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Pro Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ala Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Glu Arg Gly His Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser

225					230					235				240	
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
				245					250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro
			260					265					270		
Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
		275					280					285			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
	290				295						300				
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
305					310						315				320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr
				325					330					335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
			340					345					350		
Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		355					360					365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
	370					375					380				
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390					395					400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
			405					410					415		
Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
		420					425					430			
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys
		435				440						445			

<210> 337

<211> 215

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> H4H9048P2

aa1-108: LCVR

aa109-215: LC константная

<400> 337

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	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Pro
			85						90					95	
Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala
		100						105					110		
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser
		115					120					125			
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu
	130					135					140				
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser
145				150						155				160	
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
			165						170					175	
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val
		180						185					190		

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют за связывание с человеческим белком программируемой смерти-1 (PD-1) с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащее области определяющие комплементарность (CDR) вариабельной области (HCVR) тяжелой цепи, где HCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1; и CDR вариабельной области легкой цепи (LCVR), где LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1, и, где антитело имеет одно или несколько из следующих свойств:

(a) блокирует связывание белка PD-1 человека с PD-L1 с IC_{50} меньшей, чем 3 нМ, измеренной методом конкурентного сэндвич-анализа ELISA при 25°C;

(b) связывается с мономерным PD-1 человека с константой равновесия диссоциации для связывания (K_D) меньшей, чем приблизительно 50 нМ, измеренной при анализе методом поверхностного плазмонного резонанса при 37°C;

(c) связывается с мономерным PD-1 человека с K_D , меньшей, чем приблизительно 12 нМ, при анализе методом поверхностного плазмонного резонанса при 25°C;

(d) связывается с мономерным PD-1 обезьяны с K_D , меньшей, чем приблизительно 8,5 нМ при анализе методом поверхностного плазмонного резонанса при 25°C;

(e) связывается с мономерным PD-1 человека с периодом половинной диссоциации ($t_{1/2}$) большим, чем приблизительно 6,3 минуты, измеренном при анализе методом поверхностного плазмонного резонанса при 25°C; и

(f) связывается с мономерным PD-1 человека с периодом половинной диссоциации ($t_{1/2}$) большим, чем приблизительно 0,9 минуты, измеренном при анализе методом поверхностного плазмонного резонанса при 37°C.

2. Изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как приведено в Таблице 1.

3. Изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, где эталонное антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 130/138, 162/170, 234/202 и 314/186.

4. Изолированное человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-1 человека, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1.

5. Изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4, содержащие HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1.

6. Изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пп.4 или 5, содежащие LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1.

7. Изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п.4-6, содержащие: (a) HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1; и (b) LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1.

8. Изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п.1-7, содержащие:

(a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID

NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 220, 228, 236, 244, 252, 260, 268, 276, 284, 292, 300, 308 и 316;

(b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 222, 230, 238, 246, 254, 262, 270, 278, 286, 294, 302, 310 и 318;

(c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 224, 232, 240, 248, 256, 264, 272, 280, 288, 296, 304, 312 и 320;

(d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188 и 204;

(e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190 и 206; и

(f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192 и 208.

9. Изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые блокируют связывание PD-1 с PD-L1, содержащие CDR из HCVR, где HCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 34, 50, 66, 82, 114, 130, 162, 178, 194, 210, 218, 226, 234, 242, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 306 и 314; и CDR из LCVR, где LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 42, 58, 74, 90, 122, 138, 170, 186 и 202.

10. Изолированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.9, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 130/138, 162/170, 234/202 и 314/186.

11. Изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с PD-1 человека, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент увеличивает связывание PD-1 с PD-L1, измеренное методом конкурентного сэндвич-анализа ELISA при 25°C.

12. Изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.11, где антитело содержит CDR из HCVR, где HCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 98 и 250; и CDR из LCVR, где LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 106 и 202.

13. Изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.12, где антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 98/106, и 250/202.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п.1-13, где антитело представляет собой мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с PD-1 в соответствии с любым из п.п.1-14, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

16. Изолированная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR антитела, как приведено в любом из п.п.1-13.

17. Изолированная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует LCVR антитела, как приведено в любом из п.п.1-13.

18. Вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность по п.16 или 17.

19. Клетка, экспрессирующая вектор по п.18.

20. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или ее антигенсвязывающий фрагмент, содержащие первую антигенсвязывающую специфичность, которая специфически связывается с PD-1, и вторую антигенсвязывающую специфичность,

которая содержит внеклеточный домен PD-L1 или PD-L2 или его фрагмент.

21. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или ее антигенсвязывающий фрагмент, содержащие первую антигенсвязывающую специфичность, которая специфически связывается с PD-1, и вторую антигенсвязывающую специфичность, которая специфически связывается с T-клеточным соингибитором.

22. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или ее фрагмент по п.20 или 21, где первая антигенсвязывающая специфичность содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1.

23. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или ее фрагмент по любому из п.п.20-22, где первая антигенсвязывающая специфичность содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1; и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1.

24. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или ее фрагмент по п.23, где первая антигенсвязывающая специфичность содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 130/138, 162/170, 234/202 и 314/186.

25. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или ее фрагмент по п.21, где вторая антигенсвязывающая специфичность специфически связывается с T-клеточным соингибитором, выбранным из группы, состоящей из LAG3, TIM3, B7-1, STLA-4, VTLA, CD28, 2B4, LY108, TIGIT, ICOS и CD160.

26. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или ее фрагмент по любому из п.п.20-25 для применения при лечении злокачественного новообразования, выбранного из группы, состоящей из почечно-клеточной карциномы, рака ободочной и

прямой кишки, рака яичника, рака простаты, рака молочной железы, рака толстой кишки, немелкоклеточного рака легких и меланомы.

27. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или ее фрагмент по любому из п.п.20–25 для применения при лечении хронической вирусной инфекции, вызываемой вирусом, выбранным из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса гепатита В (HBV), вируса гепатита С (HCV), вируса папилломы человека (HPV), вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) и вируса иммунодефицита обезьяны (SIV).

28. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или ее фрагмент, содержащие первую антигенсвязывающую специфичность, которая специфически связывается с PD-1, и вторую антигенсвязывающую специфичность, которая специфически связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из антигена, специфичного для аутоиммунной ткани, Т-клеточного рецептора и Fc рецептора.

29. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или ее фрагмент по п.28, где первая антигенсвязывающая специфичность содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) содержащиеся в любой из последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1.

30. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или ее фрагмент по п.28 или 29, где первая антигенсвязывающая специфичность содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1; и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1.

31. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или ее фрагмент по п.30, где первая антигенсвязывающая специфичность содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 130/138, 162/170,

234/202 и 314/186.

32. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или ее фрагмент по п.28, где первая антигенсвязывающая специфичность содержит внеклеточный домен PD-L1 и/или PD-L2 или его фрагмент.

33. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или ее фрагмент по любому из п.п.28-32, где вторая антигенсвязывающая специфичность специфически связывается с антигеном, специфичным для аутоиммунной ткани.

34. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или ее фрагмент по п.33, где антиген, специфичный для аутоиммунной ткани ассоциирован с очаговой алопецией, аутоиммунным гепатитом, целиакией, болезнью Грейвса, синдромом Гийена-Барре, тиреоидитом Хашимото, гемолитической анемией, воспалительным заболеванием кишечника, воспалительными миопатиями, рассеянным склерозом, первичным билиарным циррозом, псориазом, ревматоидным артритом, склеродермой, синдромом Сегрена, системной красной волчанкой, витилиго, аутоиммунным панкреатитом, аутоиммунной крапивницей, аутоиммунной тромбоцитопенической пурпурой, болезнью Крона, диабетом типа I, эозинофильным фасциитом, эозинофильным энтергастритом, синдромом Гудпасчера, тяжелой миастенией, псориатическим артритом, ревматической лихорадкой, язвенным колитом, васкулитом или гранулематозом Вегенера.

35. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или ее фрагмент по любому из п.п.28-32, где вторая антигенсвязывающая специфичность специфически связывается с одним из T-клеточного рецептора, Fc α рецептора, Fc γ рецептора или CD19.

36. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или ее фрагмент по любому из п.п.28-35 для применения при лечении аутоиммунного заболевания или расстройства, выбранного из группы, состоящей из очаговой алопеции, аутоиммунного гепатита, целиакии, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, тиреоидита Хашимото, гемолитической анемии, воспалительного заболевания кишечника, воспалительных миопатий, рассеянного склероза, первичного билиарного цирроза, псориаза, ревматоидного артрита,

склеродермы, синдрома Сегрена, системной красной волчанки, витилиго, аутоиммунного панкреатита, аутоиммунной крапивницы, аутоиммунной тромбоцитопенической пурпуры, болезни Крона, диабета типа I, эозинофильного фасциита, эозинофильного энтерогастрита, синдрома Гудпасчера, тяжелой миастении, псориатического артрита, ревматической лихорадки, язвенного колита, васкулита и гранулематоза Вегенера.

37. Способ усиления иммунного ответа у субъекта, способ, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из п.п.1-13; или мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу или ее фрагмент в соответствии с любым из п.п.20-25.

38. Способ ингибирования Т-регуляторных (Treg) клеток у субъекта, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей изолированное человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из п.п.1-13; или мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу или ее фрагмент в соответствии с любым из п.п.20-25.

39. Способ усиления активации Т-клеток у субъекта, способ, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из п.п.1-13; или мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу или ее фрагмент в соответствии с любым из п.п.20-25.

40. Способ по любому из п.п.37-39, где субъект имеет заболевание или расстройство, выбранное из группы, состоящей из рака мозга, почечно-клеточной карциномы, рака яичника, рака простаты, рака толстой кишки, немелкоклеточного рака легких, плоскоклеточного рака области головы и шеи, рака ободочной и прямой кишки и меланомы.

41. Способ по любому из п.п.37-39, где субъект имеет хроническую вирусную инфекцию, вызываемую вирусом, выбранным из группы, состоящей из ВИЧ, HCV, HBV, HPV, LCMV и SIV.

42. Способ ингибирования роста опухоли или опухолевых клеток, включающий контактирование опухоли или опухолевых клеток с терапевтически эффективным количеством антитела по

любому из п.п.1-13 или 20-25.

43. Способ ингибирования активации Т-клеток у субъекта, способ, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с любым из п.п.1-13; или мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы или ее фрагмента в соответствии с любым из п.п.28-35.

44. Способ по п.43, где субъект имеет аутоиммунное заболевание или расстройство, выбранное из группы, состоящей из очаговой алопеции, аутоиммунного гепатита, целиакии, болезни Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреоидита Хашимото, гемолитической анемии, воспалительного заболевания кишечника, воспалительных миопатий, рассеянного склероза, первичного билиарного цирроза, псориаза, ревматоидного артрита, склеродермы, синдрома Сегрена, системной красной волчанки, витилиго, аутоиммунного панкреатита, аутоиммунной крапивницы, аутоиммунной тромбоцитопенической пурпуры, болезни Крона, диабета типа I, эозинофильного фасциита, эозинофильного энтерогастрита, синдрома Гудпасчера, тяжелой миастении, псориазического артрита, ревматической лихорадки, язвенного колита, васкулита и гранулематоза Вегенера.

45. Способ по любому из п.п.37-44, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию, содержащую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вводят субъекту в комбинации со вторым терапевтическим средством.

46. Способ по п.45, где второе терапевтическое средство выбирают из группы, состоящей из NSAID, кортикостероида, антитела к различным Т-клеточным соингибиторам, антитела к опухолеспецифичному антигену, антитела к антигену аутоиммунной ткани, антитела к антигену клетки, инфицированной вирусом, антитела к PD-L1, пищевой добавки, такой как антиоксидант, антагониста VEGF, химиотерапевтического средства, цитотоксичного средства, противовирусного лекарственного средства, облучения и любой другой терапии, применимой для уменьшения, по меньшей мере, одного симптома, ассоциированного с заболеванием или расстройством.

47. Способ по любому из п.п.37-46, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят подкожно, внутривенно, внутривожно, внутрибрюшинно, перорально, внутримышечно или интракраниально.

48. Способ по любому из п.п.37-47, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят при дозе, равной от приблизительно 0,1 мг/кг массы тела до приблизительно 60 мг/кг массы тела субъекта.

49. Изолированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание PD-1 человека с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 330, 332, 334 и 336.

50. Изолированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурируют за связывание PD-1 человека с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331, 333, 335 и 337.

51. Изолированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурируют за связывание PD-1 человека с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащие пару аминокислотных последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 330/331, 332/333, 334/335 и 336/337.

52. Фармацевтическая композиция, содержащая изолированное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с PD-1 по любому из п.п.49-51, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

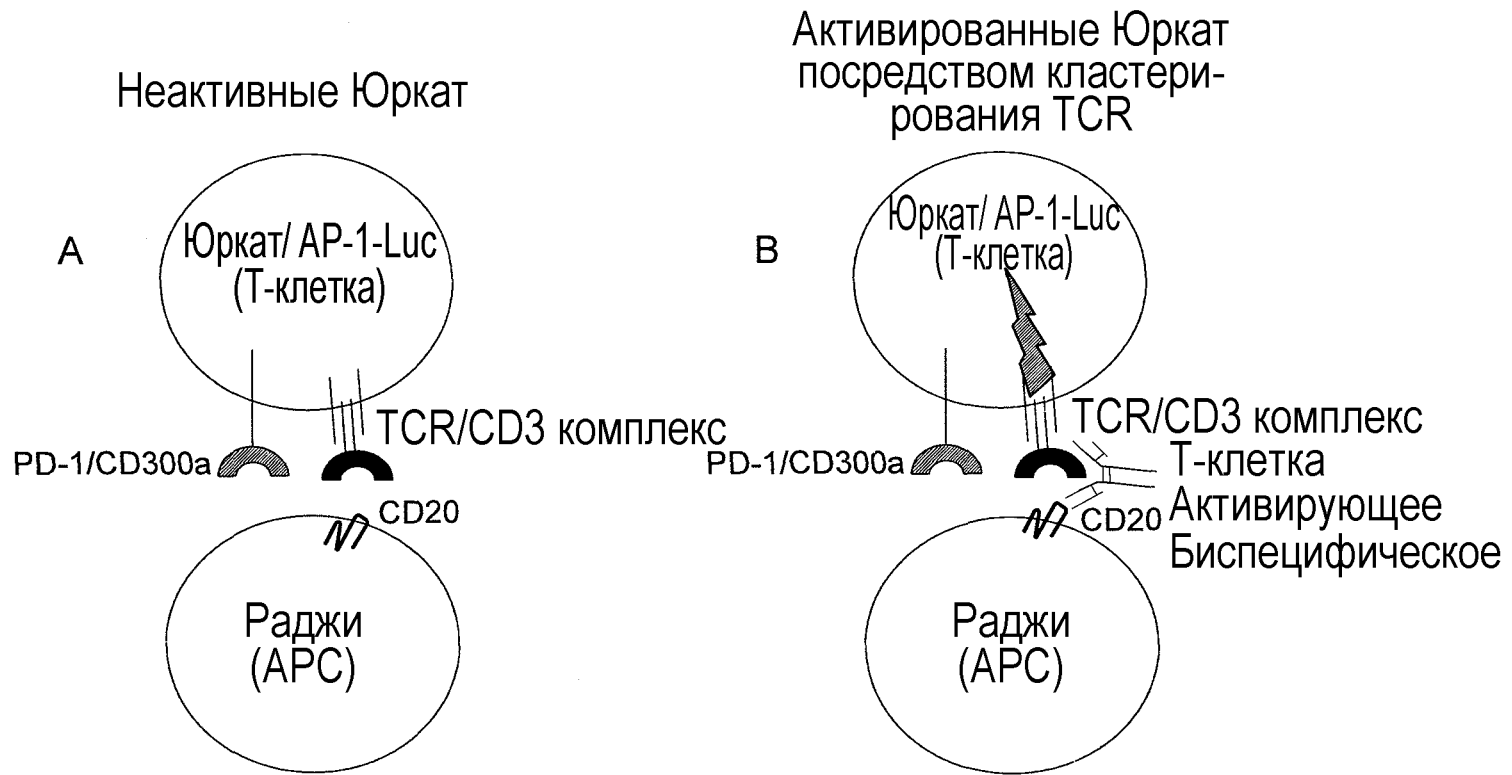
53. Изолированная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь антитела, приведенного в любом из п.п.49-51.

54. Изолированная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь антитела, приведенного в любом из п.п.49-51.

55. Вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность по п.53 или 54.

56. Клетка, экспрессирующая вектор по п.55.

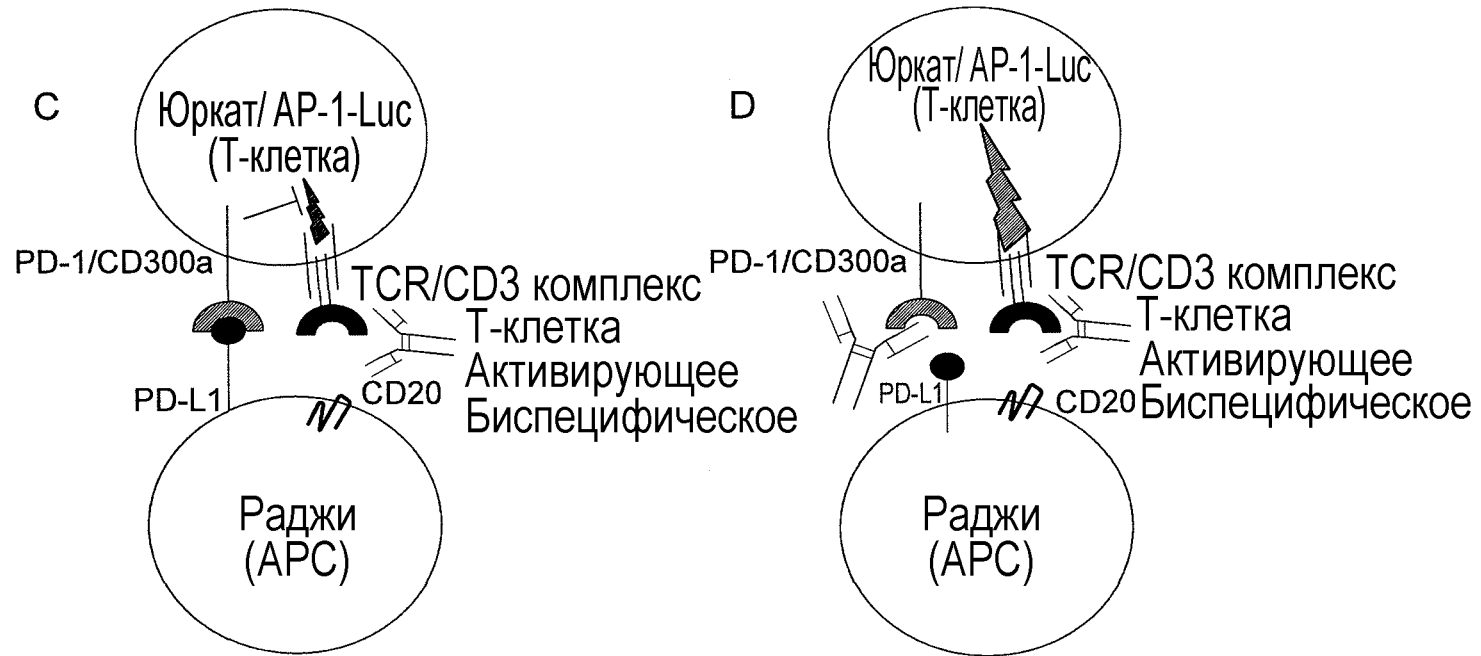
По доверенности



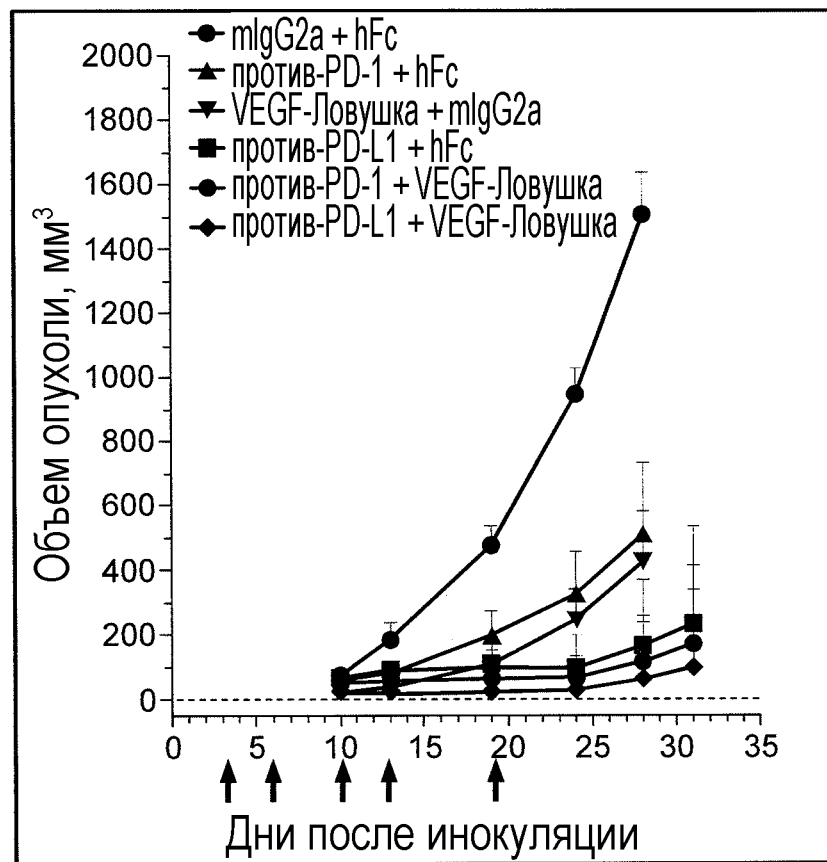
ФИГ. 1

Активация PD-1 ослабляет
ответ у активированных Юркат

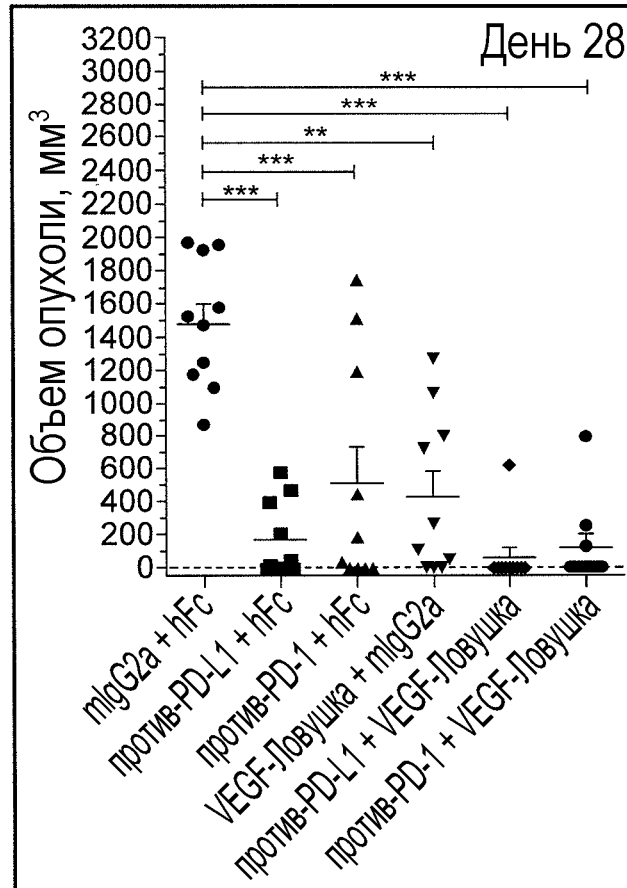
Блокирование PD-1 облегчает
ответ у активированных Юркат



ФИГ. 1 (продолжение)



ФИГ. 2



ФИГ. 3