

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201990978 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

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

(22) Дата подачи заявки
2017.11.08

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-1

(31) 1618833.6

(32) 2016.11.08

(33) GB

(86) PCT/EP2017/078595

(87) WO 2018/087143 2018.05.17

(88) 2018.12.13

(71) Заявитель:
АКТИДЖЕН ЛТД (GB)

(72) Изобретатель:
Дункан Алекс, Маккорт Мэттью,
Дайсон Майкл, Блэквуд Джон (GB)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В соответствии с настоящим изобретением предложены антитела, которые связываются с PD-1. Настоящее изобретение также предлагает иммуноконъюгаты и композиции, содержащие такие антитела. В соответствии с настоящим изобретением также предложены способы получения таких антител. В настоящем изобретении дополнительно предложено применение таких антител для целей терапии и диагностики.

A1

201990978

201990978

A1

АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-1

Настоящее изобретение в общем смысле относится к области антител, в частности, к антителам, которые связываются с PD-1. Такие антитела против PD-1 можно применять в терапии и диагностике, например, для лечения рака. Композиции на основе антител и
5 способы и применения согласно настоящему изобретению также относятся к применению иммуноконъюгатов и других терапевтических комбинаций, наборов и способов.

На сегодняшний день лечение рака все еще остается одной из наибольших нереализованных потребностей медицины. Хотя за последние десятилетия шел прогресс в области терапии рака, рак остается одной из основных причин смерти. По мере того, как
10 популяции в промышленно развитых странах пользуются преимуществом более длительной средней прогнозируемой продолжительности жизни, возрастает потребность в улучшенных или новых методах лечения рака.

Относительно новым подходом является область иммунотерапии контрольных точек. Данный подход, по большей части, возник из недавно полученных сведений о том, что рак
15 гораздо более разнообразный, чем изначально ожидали. Даже у одного пациента одна опухоль будет содержать дюжины, если не сотни различных типов клеток. Это ограничивает подход с использованием цитотоксических агентов, применяемых для терапии рака, таких как агенты на основе платины (например, цисплатин) или аналоги нуклеотидов (например, фторурацил), так как каждый тип клеток будет реагировать на цитотоксический агент немного
20 отличным образом. Некоторые клетки, которые более устойчивы, вероятно, выживут и вызовут рецидив.

Напротив, иммунная система гораздо более стабильна и схожа между пациентами, и известно, что для роста опухоли необходимо, чтобы иммунная система стала толерантной к опухоли (механизм ускользания). За последние годы было получено огромное количество
25 результатов, демонстрирующих, как опухоль этого достигает, и доказали, что нацеливание на такие взаимодействия между опухолью и иммунной системой является эффективным подходом к терапии рака. Идея состоит не в том, чтобы убить опухоль напрямую лекарственными средствами, но, вместо этого, активировать иммунную систему, чтобы она уничтожила опухоль.

Хорошо исследованной областью в сфере иммунотерапии является взаимодействие PD-1 (белка 1 запрограммированной гибели клетки) и PD-L1 (лиганда белка 1
30 запрограммированной гибели клетки).

Указанные молекулы и их взаимодействие впервые обнаружили в контексте аутоиммунных заболеваний. PD-1 представляет собой молекулу суперсемейства
35 иммуноглобулинов и в большом количестве экспрессируется на поверхности различных Т-клеток и про-В-клеток. PD-L1 экспрессируется на уровне мРНК в большинстве здоровых

клеток, но под строгим посттрансляционным контролем; это означает, что в большинстве здоровых тканей PD-L1 не будет обнаруживаться на поверхностях клеток. Такая репрессия прекращается под действием сигнальных молекул, таких как IFN-гамма (IFN γ), которые обычно обнаруживают в сайтах воспаления. Присутствие интерферона запускает экспрессию PD-L1 на поверхности клеток, которые затем взаимодействуют с экспрессирующими PD-1 T-клетками, подавая сигнал к деактивации. Физиологическая функция, следовательно, состоит в снижении воспаления, чтобы предотвратить нежелательное повреждение ткани и постоянное воспаление.

Было показано, что то же механизм важен для деактивации иммунного ответа на опухоли посредством механизма, который часто называют адаптивной устойчивостью. Растущая опухоль обычно узнается иммунной системой. В результате этого большое количество иммунных клеток присоединяется к очагу опухоли, создавая особенное микроокружение. Большинство привлеченных клеток (Teff, TIL) исходно активны, секретируют стимулирующие сигналы, включая IFN-g, создают окружение, очень сходное с воспалительными очагами. Это активирует экспрессию PD-L1 на поверхности опухолевых клеток, выключая эффекторные T-клетки в опухоли и около опухоли путем индукции анергии, истощения или апоптоза и путем индукции сигналов, приводящих к понижающей регуляции (IL-10). Идея терапевтического агента, нацеленного на PD-1, состоит в удалении такого блока; если его осуществили правильно, то эффекторные T-клетки должны вновь стать активными и начать атаковать опухоль.

Механизм ускользания от иммунного ответа обнаружили во многих различных опухолях из различных линий, включая немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), меланому, почечно-клеточный рак (ПКК), колоректальный рак, уротелиальный рак мочевого пузыря и множество других раков.

В результате данных открытий были разработаны лекарственные средства для терапии рака, ингибирующие взаимодействие PD-1/PD-L1. Ввиду аффинности и стабильности, антитела оказались предпочтительным классом молекул, и на сегодняшний день два антитела, нацеленные на PD-1, одобрены FDA для применения в США, а именно, ниволумаб (Опдиво, Bristol-Myers Squibb) и пембролизумаб (Китруда, Merck).

Ниволумаб одобрен в качестве терапии первой линии в комбинации с ипилимумабом для лечения BRAF-отрицательной метастатической меланомы и в качестве терапии второй линии для лечения плоскоклеточного НМРЛ и ПКК, не отвечающих на ипилимумаб отдельно.

Китруда одобрен в качестве терапии второй линии для лечения НМРЛ, метастатической меланомы, и его допустили к ускоренному одобрению в качестве терапии второй линии для лечения рецидивирующего или метастатического плоскоклеточного рака головы и шеи.

На сегодняшний день проводится множество других клинических испытаний, и ожидается, что перечень видов рака, которые будут лечить направленной на PD-1/PD-L1 терапией, сильно расширится.

Хотя оба антитела нацелены на одну и ту же молекулу (PD-1), в клинических
5 испытаниях все же видны различия, которые, вероятно, обусловлены различными аффинностями и фармакодинамикой. Это означает, что по-прежнему существует потребность в идентификации дополнительных соединений, нацеленных на данное взаимодействие, и в сравнении их действия на большое количество излечимых раков. Это демонстрируется значительным количеством соединений, которые все еще находятся в
10 разработке, например, PDR001 (Novartis), JS001 (JunShi Biosciences).

Авторы настоящего изобретения предложили антитела против PD-1, которые способны ингибировать взаимодействие PD-1/PD-L1.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено антитело, например, выделенное антитело, которое связывается с PD-1 и которое содержит по меньшей мере одну
15 переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарности области (CDR), и по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(a) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 5, или последовательность, по существу гомологичную
20 указанной последовательности,

(b) CDR2 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 6, или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности, и

(c) CDR3 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 7, или
25 последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности; и/или при этом указанная переменная область легкой цепи содержит:

(d) CDR1 переменной области легкой цепи (VL), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 8, или последовательность, по существу гомологичную
указанной последовательности,

(e) CDR2 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 9, или
30 последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности, и

(f) CDR3 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 10, или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности;

при этом указанная по существу гомологичная последовательность представляет
35 собой последовательность, содержащую 1, 2 или 3 замены аминокислот по сравнению с данной последовательностью CDR, или при этом указанная по существу гомологичная

последовательность представляет собой последовательность, содержащую консервативные замены аминокислот в данной последовательности CDR.

В предпочтительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, которое связывается с PD-1 и которое содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR, и по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(a) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 5, или с последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности,

(b) CDR2 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 6, или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности, и

(c) CDR3 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 7, или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности; и

при этом указанная переменная область легкой цепи содержит:

(d) CDR1 переменной области легкой цепи (VL), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 8, или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности,

(e) CDR2 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 9, или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности, и

(f) CDR3 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 10, или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности;

при этом указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2 или 3 замены аминокислот по сравнению с данной последовательностью CDR, или при этом указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую консервативные замены аминокислот в данной последовательности CDR.

В предпочтительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, которое содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR, и по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(a) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 5, или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности,

- (b) CDR2 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 6, или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности, и
- (c) CDR3 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 7, или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности;

при этом указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2 или 3 замены аминокислот по сравнению с данной последовательностью CDR, или при этом указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую консервативные замены аминокислот в данной последовательности CDR.

В особенно предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR, и по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

- (a) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 5,
- (b) CDR2 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 6, и
- (c) CDR3 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 7.

В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, которое содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR, и по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR, при этом указанная переменная область легкой цепи содержит:

- (d) CDR1 переменной области легкой цепи (VL), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 8, или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности,
- (e) CDR2 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 9, или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности, и
- (f) CDR3 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 10, или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности;

при этом указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2 или 3 замены аминокислот по сравнению с данной последовательностью CDR, или при этом указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую консервативные замены аминокислот в данной последовательности CDR.

В предпочтительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, которое содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR, и по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR, при этом указанная переменная область легкой цепи содержит:

- (d) CDR1 переменной области легкой цепи (VL), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 8,
- (e) CDR2 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 9, и
- (f) CDR3 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 10.

В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, которое содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR (с последовательностью, описанной в других местах в данной заявке), и по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR, при этом указанная переменная область легкой цепи содержит:

- (d) CDR1 переменной области легкой цепи (VL), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 26, или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности,
- (e) CDR2 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 9, или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности, и
- (f) CDR3 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 10, или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности;

при этом указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2 или 3 замены аминокислот по сравнению с данной последовательностью CDR, или при этом указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую консервативные замены аминокислот в данной последовательности CDR.

В предпочтительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, которое содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR, и по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR, при этом указанная переменная область легкой цепи содержит:

- (d) CDR1 переменной области легкой цепи (VL), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 26,
- (e) CDR2 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 9, и
- (f) CDR3 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 10.

В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, которое содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR (с последовательностью, описанной в других местах в данной заявке), и по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR, при этом указанная переменная область легкой цепи содержит:

(d) CDR1 переменной области легкой цепи (VL), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 62, или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности,

(e) CDR2 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 63, или или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности, и

(f) CDR3 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 64, или или последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности;

при этом указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2 или 3 замены аминокислот по сравнению с данной последовательностью CDR, или при этом указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую консервативные замены аминокислот в данной последовательности CDR.

В предпочтительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, которое содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR, и по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR, при этом указанная переменная область легкой цепи содержит:

(d) CDR1 переменной области легкой цепи (VL), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 62,

(e) CDR2 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 63, и

(f) CDR3 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 64.

В особенно предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR, и по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(a) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 5,

(b) CDR2 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 6, и

- (с) CDR3 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 7; и
при этом указанная вариабельная область легкой цепи содержит:
- (d) CDR1 вариабельной области легкой цепи (VL), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 8,
- 5 (е) CDR2 VL который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 9, и
- (f) CDR3 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 10.

В другом особенно предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое содержит по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR, и по меньшей мере одну вариабельную область легкой цепи, которая содержит три CDR, при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

- (a) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 5,
- 15 (b) CDR2 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 6, и
- (с) CDR3 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 7; и
при этом указанная вариабельная область легкой цепи содержит:
- (d) CDR1 вариабельной области легкой цепи (VL), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 26,
- 20 (е) CDR2 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 9, и
- (f) CDR3 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 10.

В другом особенно предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое содержит по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR, и по меньшей мере одну вариабельную область легкой цепи, которая содержит три CDR, при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

- (a) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 5,
- 30 (b) CDR2 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 6, и
- (с) CDR3 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 7; и
при этом указанная вариабельная область легкой цепи содержит:
- (d) CDR1 вариабельной области легкой цепи (VL), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 62,
- 35 (е) CDR2 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 63, и
- (f) CDR3 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 64.

В некоторых особенно предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения предложено антитело, содержащее домен VH с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 3, или 21, или 39, или 57, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и/или домен VL с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 4, или 22, или 40, или 58, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности.

В дополнительных предпочтительных вариантах реализации предложено антитело, содержащее домен VH с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 3, или 21, или 39, или 57, и домен VL, который содержит 3 CDR легкой цепи. Предпочтительно указанные CDR легкой цепи представлены следующими последовательностями: SEQ ID NO 8, 9 и 10; или 26, 9 и 10; или 62, 63 и 64.

В дополнительных предпочтительных вариантах реализации предложено антитело, содержащее домен VL с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 4, или 22, или 40, или 58, и домен VH, который содержит 3 CDR тяжелой цепи. Предпочтительно указанные CDR тяжелой цепи представлены следующими последовательностями: SEQ ID NO 5, 6 и 7.

В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, содержащее домен VH с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 3, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и/или домен VL с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 4, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности.

В предпочтительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, в котором вариабельная область легкой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 4 или последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной указанной последовательности (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 98%), и/или в котором вариабельная область тяжелой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 3 или последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной указанной последовательности (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 98%).

В предпочтительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, в котором вариабельная область легкой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 4, и/или в котором вариабельная область тяжелой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 3.

В предпочтительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, в котором вариабельная область легкой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 4, и в котором вариабельная область тяжелой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 3.

В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, содержащее домен VH с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 21, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и/или домен VL с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 22, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности.

В предпочтительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, в котором переменная область легкой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 22 или последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной указанной последовательности (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 98%), и/или в котором переменная область тяжелой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 21 или последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной указанной последовательности (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 98%).

В предпочтительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, в котором переменная область легкой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 22, и/или в котором переменная область тяжелой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 21.

В предпочтительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, в котором переменная область легкой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 22, и в котором переменная область тяжелой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 21.

В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, содержащее домен VH с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 39, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и/или домен VL с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 40, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности.

В предпочтительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, в котором переменная область легкой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 40 или последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной указанной последовательности (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 98%), и/или в котором переменная область тяжелой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 39 или последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной указанной последовательности (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 98%).

В предпочтительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, в котором переменная область легкой цепи представлена

последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 40, и/или в котором вариабельная область тяжелой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 39.

В предпочтительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, в котором вариабельная область легкой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 40, и в котором вариабельная область тяжелой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 39.

В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, содержащее домен VH с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 57, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и/или домен VL с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 58, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности.

В предпочтительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, в котором вариабельная область легкой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 58 или последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной указанной последовательности (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 98%), и/или в котором вариабельная область тяжелой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 57 или последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной указанной последовательности (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 98%).

В предпочтительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, в котором вариабельная область легкой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 58 и/или в котором вариабельная область тяжелой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 57.

В предпочтительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, в котором вариабельная область легкой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 58 и в котором вариабельная область тяжелой цепи представлена последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 57.

В других предпочтительных вариантах реализации предложены IgG-формы антител 273_C12_C05 (исходного клона), 273_C12_C05 (варианта 1), 273_C12_C05 (варианта 2) и 273_C01_A12, предпочтительно полноразмерные IgG-формы. IgG₂-форма любого из данных антител наиболее предпочтительна. Конечно, понятно, что полноразмерные антитела IgG будут, как правило, содержать две по существу идентичные тяжелые цепи и две по существу идентичные легкие цепи.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено полноразмерное антитело IgG, которое содержит тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 85 (аминокислот) или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и/или легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 86 (аминокислот)

или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности. Также предпочтительно антитело IgG, которое содержит тяжелую цепь, кодируемую последовательностью SEQ ID NO: 87 или последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и/или легкую цепь, кодируемую последовательностью SEQ ID NO: 88 или последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности.

В предпочтительном варианте реализации антитело содержит тяжелую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 85, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 98%), и/или легкую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 86, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 98%).

В предпочтительном варианте реализации антитело содержит тяжелую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 85, и/или легкую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 86.

В предпочтительном варианте реализации антитело содержит тяжелую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 85, и легкую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 86.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено полноразмерное антитело IgG, которое содержит тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 89 (аминокислот) или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и/или легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 90 (аминокислот) или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности. Также предпочтительно антитело IgG, которое содержит тяжелую цепь, кодируемую последовательностью SEQ ID NO: 91 или последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и/или легкую цепь, кодируемую последовательностью SEQ ID NO: 92 или последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности.

В предпочтительном варианте реализации антитело содержит тяжелую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 89, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 98%), и/или легкую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 90, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 98%).

В предпочтительном варианте реализации антитело содержит тяжелую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 89, и/или легкую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 90.

В предпочтительном варианте реализации антитело содержит тяжелую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 89, и легкую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 90.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено
5 полноразмерное антитело IgG, которое содержит тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 93 (аминокислот) или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и/или легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 94 (аминокислот) или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности. Также предпочтительно антитело IgG, которое содержит тяжелую цепь, кодируемую
10 последовательностью SEQ ID NO: 95 или последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и/или легкую цепь, кодируемую последовательностью SEQ ID NO: 96 или последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности.

В предпочтительном варианте реализации антитело содержит тяжелую цепь, которая
15 включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 93, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 98%), и/или легкую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 94, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную
20 указанной последовательности (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 98%).

В предпочтительном варианте реализации антитело содержит тяжелую цепь, которая
20 включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 93, и/или легкую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 94.

В предпочтительном варианте реализации антитело содержит тяжелую цепь, которая
25 включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 93, и легкую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 94.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено
30 полноразмерное антитело IgG, которое содержит тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 97 (аминокислот) или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и/или легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 98 (аминокислот) или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности. Также предпочтительно антитело IgG, которое содержит тяжелую цепь, кодируемую
35 последовательностью SEQ ID NO: 99 или последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и/или легкую цепь, кодируемую последовательностью SEQ ID NO: 100 или последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности.

В предпочтительном варианте реализации антитело содержит тяжелую цепь, которая
включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 97, или последовательность, по

меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 98%), и/или легкую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 98, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 98%).

5 В предпочтительном варианте реализации антитело содержит тяжелую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 97, и/или легкую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 98.

В предпочтительном варианте реализации антитело содержит тяжелую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 97, и легкую цепь, которая включает
10 последовательность аминокислот SEQ ID NO: 98.

Антитела на основе последовательностей антител 273_C12_C05 (исходного клона), 273_C12_C05 (варианта 1), 273_C12_C05 (варианта 2) и 273_C01_A12, представленных в таблицах A, B, C и D, предпочтительны. В некоторых вариантах реализации антитела на основе последовательностей антитела 273_C12_C05 (варианта 1), описанных в таблице B,
15 предпочтительны. 273_C12_C05 (исходный клон) в данной заявке также называют просто 273_C12_C05.

В качестве примеров настоящего изобретения предложены моноклональное антитела 1h07 273_C12_C05 (исходный клон), 273_C12_C05 (вариант 1), 273_C12_C05 (вариант 2) и 273_C01_A12, последовательности которых представлены в таблицах A, B, C и D в данной
20 заявке. Домены CDR, домены VH и VL и IgG (тяжелая и легкая цепи) представлены в таблицах A, B, C и D в данной заявке. Антитела, содержащие данные домены CDR, или домены VH и VL, или последовательности IgG (или последовательности, по существу гомологичные указанным последовательностям), являются предпочтительными аспектами настоящего изобретения.

25 Некоторые примеры по существу гомологичных последовательностей представляют собой последовательности, которые по меньшей мере на 65% идентичны описанным последовательностям аминокислот. В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, которая включает участок последовательности аминокислот, по меньшей мере
30 приблизительно на 65%, 70% или 75%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 85%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 90% или 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 97%, 98% или 99% идентичный последовательности аминокислот SEQ ID NO: 4, или 22, или 40, или 58; и/или по меньшей
35 мере одну переменную область тяжелой цепи, которая включает участок последовательности аминокислот, по меньшей мере приблизительно на 65%, 70% или 75%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80%, более предпочтительно

по меньшей мере приблизительно на 85%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 90% или 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 97%, 98% или 99% идентичный последовательности аминокислот SEQ ID NO: 3, или 21, или 39, или 57.

5 Другие предпочтительные примеры по существу гомологичных последовательностей представляют собой последовательности, содержащие консервативные замены аминокислот в описанных последовательностях аминокислот.

Другие предпочтительные примеры по существу гомологичных последовательностей представляют собой последовательности, содержащие 1, 2 или 3, предпочтительно 1 или 2 (более предпочтительно 1), измененные аминокислоты в одном или более из описанных участков CDR. Такие изменения могут представлять собой консервативные или неконсервативные замены аминокислот, или их комбинацию.

В таких вариантах реализации предпочтительные изменения представляют собой консервативные замены аминокислот.

15 В другом аспекте настоящего изобретения предложено антитело, например, выделенное антитело, которое связывается с PD-1 и которое содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR, и по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

20 (a) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 5, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности,

(b) CDR2 VH с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 6, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и

25 (c) CDR3 VH с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 7, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности; и/или (предпочтительно “и”)

при этом указанная переменная область легкой цепи содержит:

30 (d) CDR1 переменной области легкой цепи (VL) с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 26, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности,

(e) CDR2 VL с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 9, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и

35 (f) CDR3 VL с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 10, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности;

при этом указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2 или 3 замены аминокислот по сравнению с

данной последовательностью CDR, или при этом указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую консервативные замены аминокислот в данной последовательности CDR.

В предпочтительных вариантах реализации данного аспекта настоящего изобретения предложены антитела, включающие одну или более из последовательностей антител (например, последовательностей CDR, и/или последовательностей домена VH и/или домена VL, и/или последовательностей тяжелой и легкой цепей IgG), которые описаны в других местах в данной заявке применительно к другим аспектам настоящего изобретения. Таким образом, обсуждение различных особенностей антител из других аспектов настоящего изобретения и предпочтительных вариантов реализации распространяется с необходимыми изменениями на данный аспект настоящего изобретения.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено антитело, например, выделенное антитело, которое связывается с PD-1 и которое содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR, и по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

- (a) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 5, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности,
- (b) CDR2 VH с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 6, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и
- (c) CDR3 VH с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 7, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности; и/или (предпочтительно "и")

при этом указанная переменная область легкой цепи содержит:

- (d) CDR1 переменной области легкой цепи (VL) с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 62, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности,
- (e) CDR2 VL с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 63, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и
- (f) CDR3 VL с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 64, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности;

при этом указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2 или 3 замены аминокислот по сравнению с данной последовательностью CDR, или при этом указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую консервативные замены аминокислот в данной последовательности CDR.

В предпочтительных вариантах реализации данного аспекта настоящего изобретения предложены антитела, включающие одну или более из последовательностей антител (например, последовательностей CDR, и/или последовательностей домена V_H и/или домена V_L, и/или последовательностей тяжелой и легкой цепей IgG), которые описаны в других
 5 местах в данной заявке применительно к другим аспектам настоящего изобретения. Таким образом, обсуждение различных особенностей антител из других аспектов настоящего изобретения и предпочтительных вариантов реализации распространяется с необходимыми изменениями на данный аспект настоящего изобретения.

Во всех вариантах реализации антитела, содержащие по существу гомологичные
 10 последовательности, сохраняют способность связываться с PD-1. Предпочтительно, антитела, содержащие по существу гомологичные последовательности, сохраняют одно или более (предпочтительно все) из свойств, описанных в отношении антител 273_C12_C05 (исходного клона), и/или 273_C12_C05 (варианта 1), и/или 273_C12_C05 (варианта 2) и/или 273_C01_A12.

15 Дополнительные примеры по существу гомологичных последовательностей аминокислот в соответствии с настоящим изобретением описаны в других местах в данной заявке.

CDR антител согласно настоящему изобретению предпочтительно разделены подходящими каркасными областями, такими как обнаруженные во встречающихся в природе
 20 антителах и/или в эффективных сконструированных антителах. Таким образом, V_H, V_L и отдельные последовательности CDR согласно настоящему изобретению предпочтительно находятся внутри или включены в подходящий каркас или остов, чтобы позволить связывание антигена. Такие каркасные последовательности или участки могут соответствовать встречающимся в природе каркасным областям, FR1, FR2, FR3 и/или FR4, подходящим для
 25 образования подходящего каркаса, или могут соответствовать консенсусным каркасным областям, например, идентифицированным при сравнении различных встречающихся в природе каркасных областей. В качестве альтернативы можно применять остовы или каркасы не из антител, например, каркасы Т-клеточного рецептора.

Подходящие последовательности, которые можно использовать для каркасных
 30 областей, хорошо известны и задокументированы в данной области, и можно применять любую из них. Предпочтительные последовательности каркасных областей представляют собой одну или более из каркасных областей, составляющих домены V_H и/или V_L согласно настоящему изобретению, т.е. одну или более из каркасных областей антител 273_C12_C05 (исходного клона), 273_C12_C05 (варианта 1), 273_C12_C05 (варианта 2) или 273_C01_A12,
 35 описанных в таблицах A, B, C, D и E, или каркасных областей, по существу гомологичных им, и, в частности, каркасных областей, которые позволяют сохранение специфичности к

антигену, например, каркасных областей, которые приводят к по существу такой же структуре или такой же 3D структуре антитела.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации все четыре из каркасных областей (FR) варибельной области легкой цепи (последовательности SEQ ID NO: 15, 16, 17 и 18) и/или варибельной области тяжелой цепи (последовательности SEQ ID NO: 11, 12, 13 и 14), соответственно, или по существу гомологичных им областей FR, находятся в антителах согласно настоящему изобретению.

В других предпочтительных вариантах реализации все четыре из каркасных областей (FR) варибельной области легкой цепи (последовательности SEQ ID NO: 33, 34, 35 и 36) и/или варибельной области тяжелой цепи (последовательности SEQ ID NO: 29, 30, 31 и 32), соответственно, или по существу гомологичных им областей FR, находятся в антителах согласно настоящему изобретению.

В других предпочтительных вариантах реализации все четыре из каркасных областей (FR) варибельной области легкой цепи (последовательности SEQ ID NO: 51, 52, 53 и 54) и/или варибельной области тяжелой цепи (последовательности SEQ ID NO: 47, 48, 49 и 50), соответственно, или по существу гомологичных им областей FR, находятся в антителах согласно настоящему изобретению.

В других предпочтительных вариантах реализации все четыре из каркасных областей (FR) варибельной области легкой цепи (последовательности SEQ ID NO: 69, 70, 71 и 72) и/или варибельной области тяжелой цепи (последовательности SEQ ID NO: 65, 66, 67 и 68), соответственно, или по существу гомологичных им областей FR, находятся в антителах согласно настоящему изобретению.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации каркасная область 3 варибельной области тяжелой цепи (FR3 домена VH) представляет собой или включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 79 (R V T I T A D E S X₁₀ X₁₁ T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R). В данных вариантах реализации X₁₀ и X₁₁ могут представлять собой любую аминокислоту. Предпочтительно один, более предпочтительно оба данных остатка X выбраны из следующей группы: X₁₀ представляет собой T или I (предпочтительно T); и X₁₁ представляет собой S или D (предпочтительно D). Таким образом, предпочтительная каркасная область 3 варибельной области тяжелой цепи представляет собой или включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 80 (R V T I T A D E S T/I S/D T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R).

В дополнительных вариантах реализации настоящего изобретения CDR1 VL представляет собой или включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 73 (R S S Q S L V Y X₉ D X₁₁ N T Y L N). В данных вариантах реализации X₉ и X₁₁ могут представлять собой любую аминокислоту. Предпочтительно один, более предпочтительно оба данных остатка X

выбраны из следующей группы: X_9 представляет собой H или S (предпочтительно H); и X_{11} представляет собой G или A (предпочтительно A). Таким образом, предпочтительный CDR1 VL представляет собой или включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 74 (R S S Q S L V Y H/S D G/A N T Y L N). Предпочтительные последовательности CDR1 VL согласно
 5 данному варианту реализации представляют собой последовательности SEQ ID NO: 8, 26 или 62.

В дополнительных вариантах реализации настоящего изобретения CDR2 VL представляет собой или включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 75 (E V S N R X_6 S). В данных вариантах реализации X_6 может представлять собой любую аминокислоту.
 10 Предпочтительно, X_6 представляет собой D или E (предпочтительно D). Таким образом, предпочтительный CDR2 VL представляет собой или включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 76 (E V S N R D/E S). Например, предпочтительный CDR2 VL последовательности согласно данному варианту реализации представляют собой или включают последовательности SEQ ID NO: 9 или 63.

В дополнительных вариантах реализации настоящего изобретения CDR3 VL представляет собой или включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 77 (M Q G X_4 X_5 X_6 P L T). В данных вариантах реализации X_4 , X_5 и X_6 могут представлять собой любую аминокислоту. Предпочтительно один или более, наиболее предпочтительно все из данных остатков X выбраны из следующей группы: X_4 представляет собой A или T (предпочтительно
 20 A); X_5 представляет собой Y или Q (предпочтительно Y); и X_6 представляет собой R или L (предпочтительно R). Таким образом, предпочтительный CDR3 VL представляет собой или включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 78 (M Q G A/T Y/Q R/L P L T). Например, предпочтительные последовательности CDR3 VL согласно данному варианту реализации представляют собой или включают последовательности SEQ ID NO: 10 или 64.

В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, которое содержит:
 домен VL, который содержит CDR1 VL с последовательностью SEQ ID NO: 73, CDR2 VL с последовательностью SEQ ID NO: 75 и CDR3 VL с последовательностью SEQ ID NO: 77, и/или
 домен VH, который содержит CDR1 VH с последовательностью SEQ ID NO: 5, или с
 30 последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, CDR2 VH с последовательностью SEQ ID NO: 6, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и CDR3 VH с последовательностью SEQ ID NO: 7, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, при этом
 35 указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2 или 3, предпочтительно 1 или 2 (более предпочтительно 1), измененные аминокислоты по сравнению с данной последовательностью CDR. В некоторых таких вариантах реализации CDR1 VL

предпочтительно представляет собой SEQ ID NO: 8, 26 или 62. В некоторых таких вариантах реализации CDR2 VL предпочтительно представляет собой SEQ ID NO: 9 или 63. В некоторых таких вариантах реализации CDR3 VL предпочтительно представляет собой SEQ ID NO: 10 или 64.

5 В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, которое содержит:
 домен VL, который содержит CDR1 VL с последовательностью SEQ ID NO: 74, CDR2 VL с последовательностью SEQ ID NO: 76 и CDR3 VL с последовательностью SEQ ID NO: 78, и/или
 домен VH, который содержит CDR1 VH с последовательностью SEQ ID NO: 5, или с
 10 последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, CDR2 VH с последовательностью SEQ ID NO: 6, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и CDR3 VH с последовательностью SEQ ID NO: 7, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, при этом
 15 указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2 или 3, предпочтительно 1 или 2 (более предпочтительно 1), измененные аминокислоты по сравнению с данной последовательностью CDR. В некоторых таких вариантах реализации CDR1 VL предпочтительно представляет собой SEQ ID NO: 8, 26 или 62. В некоторых таких вариантах реализации CDR2 VL предпочтительно представляет собой SEQ ID NO: 9 или 63. В некоторых
 20 таких вариантах реализации CDR3 VL предпочтительно представляет собой SEQ ID NO: 10 или 64.

В вариантах реализации настоящего изобретения, в которых одна или более из последовательностей CDR содержит остаток X_x , CDR с последовательностями, которые по существу гомологичны указанным последовательностям, содержащие 1, 2 или 3,
 25 предпочтительно 1 или 2 (более предпочтительно 1), измененные аминокислоты или замены аминокислот по сравнению с данной последовательностью CDR, также входят в объем настоящего изобретения. В некоторых таких вариантах реализации указанные изменения или замены аминокислотных остатков могут включать один или более из остатков X_x или могут быть в остатках, отличных от остатков X_x . В других таких вариантах реализации указанные
 30 изменения находятся как в остатках X_x , так и в остатках, отличных от X_x .

В других вариантах реализации настоящего изобретения антитела содержат:
 домен VL, который содержит CDR1 VL с последовательностью SEQ ID NO: 73, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, CDR2 VL с последовательностью SEQ ID NO: 75, или с последовательностью, по существу гомологичной
 35 указанной последовательности, и CDR3 VL с последовательностью SEQ ID NO: 77, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и домен VH, который содержит CDR1 VH с последовательностью SEQ ID NO: 5, или с

последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, CDR2 VH с последовательностью SEQ ID NO: 6, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и CDR3 VH с последовательностью SEQ ID NO: 7, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности. В таких вариантах реализации указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2 или 3, предпочтительно 1 или 2 (более предпочтительно 1), измененные аминокислоты по сравнению с данной последовательностью CDR.

В других вариантах реализации настоящего изобретения антитела содержат:

10 домен VL, который содержит CDR1 VL с последовательностью SEQ ID NO: 74, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, CDR2 VL с последовательностью SEQ ID NO: 76, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и CDR3 VL с последовательностью SEQ ID NO: 78, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и домен

15 VH, который содержит CDR1 VH с последовательностью SEQ ID NO: 5, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, CDR2 VH с последовательностью SEQ ID NO: 6, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности, и CDR3 VH с последовательностью SEQ ID NO: 7, или с последовательностью, по существу гомологичной указанной последовательности.

20

Как описано выше, согласно настоящему изобретению предложены антитела, например, выделенные антитела, которые связываются (или специфично распознают, или специфично связываются) с PD-1. PD-1 также известен как белок 1 запрограммированной гибели клетки.

25 PD-1 представляет собой молекулу из суперсемейства иммуноглобулинов и обильно экспрессируется на поверхности различных Т-клеток и про-В-клеток.

В соответствии с настоящим изобретением, PD-1 может быть из любого вида, например, мыши, или человека, или обезьяны (*Cynomolgus*). В предпочтительном варианте реализации PD-1 представляет собой PD-1 человека. В некоторых вариантах реализации PD-1

30 1 представляет собой PD-1 обезьяны (*Cynomolgus*). В некоторых вариантах реализации PD-1 представляет собой PD-1 мыши.

В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению связываются с PD-1 (например, с PD-1 человека, PD-1 *Cynomolgus* или PD-1 мыши) в (как определяют в) анализе методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (например, в анализе BIAcore). Подходящие анализы ППР известны в данной области. В некоторых предпочтительных анализах ППР, антитело против PD-1 (например, антитело IgG, такое как антитело IgG₂) захвачено (или иммобилизовано) на твердой подложке (например, проточной

35

кювете), например, с помощью антитела к Fc IgG человека (например, приблизительно 2000 RU антитела к Fc IgG человека), которое было иммобилизовано на проточной кювете, и затем впрыскивали различные концентрации (т.е. серии разведений, например, серии двукратных разведений) PD-1 (например, очищенного PD-1). Предпочтительные концентрации и скорости потока впрыскивания описаны в разделе Пример. Подходящие периоды ассоциации и периоды диссоциации для использования в анализе ППР известны специалисту, например, предпочтительный период ассоциации в анализе ППР составляет 2 минуты и предпочтительный период диссоциации в анализе ППР составляет 10 минут. Таким образом, в предпочтительном варианте реализации ассоциацию можно измерять в течение 2 минут и/или диссоциацию можно измерять в течение 10 минут. В некоторых вариантах реализации все измерения можно осуществить при 25°C в ФБР, pH7,4, 0,05% Tween 20. Кинетические параметры можно определить или рассчитать с помощью любой подходящей модели или программного обеспечения, например, путем подбора экспериментальных данных сенсограммы с допущением взаимодействия 1:1, например, применяя программное обеспечение BIAevaluation (GE, BR-1005-97). В некоторых вариантах реализации проводят вычитание кюветы сравнения и подбор экспериментальных данных сенсограммы с допущением взаимодействия 1:1, применяя программное обеспечение BIAevaluation (GE, BR-1005-97). Особенно предпочтительный анализ ППР описан в разделе Пример в данной заявке.

В особенно предпочтительном варианте реализации антитела согласно настоящему изобретению связываются с PD-1 (например, с PD-1 человека, PD-1 *Cynomolgus* или PD-1 мыши) в (как определяют в) анализе методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (например, анализе BIAcore), в котором

- 2000 единиц ответа (RU) антитела к Fc IgG человека (например, GE, BR-1008-39) иммобилизовали на проточных кюветах (ПК) 1 и 2 сенсорного чипа на основе декстрана (например, сенсорного чипа на основе декстрана Series 5 CM5, например, GE, BR1005-30), применяя химию образования поперечных связей с использованием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC)/N-гидроксисукцинимидом (NHS) (например, согласно протоколу сшивания амина (GE, BR-1000-50));
- Очищенное антитело против PD-1 (например, антитело IgG₂) разбавляли до концентрации 2 нМ в ФБР, pH7,4, 0,05% Tween-20 и впрыскивали в ПК2 при скорости потока 10 мкл/минуту, время контакта 60 с (обычно это приводит к захвату в среднем 20 RU антитела);
- Двукратные разведения (например, серию концентраций) PD-1 впрыскивали из 50 нМ при скорости потока 30 мкл/минуту.

- Ассоциацию измеряли в течение 2 минут и диссоциацию измеряли в течение 10 минут, и все измерения проводили при 25°C в ФБР, pH7,4, 0,05% Tween 20;
- Кинетические параметры определяют путем вычитания кюветы сравнения и подбора экспериментальных данных сенсограммы с допущением взаимодействия 1:1 (например, применяя программное обеспечение BIAevaluation, GE, BR-1005-97).

Особенно предпочтительный анализ ППР проводили, применяя устройство BIAcore T100 и следуя протоколу, соответствующему протоколу из набора для захвата антитела человека (GE, BR-1008-39), например, описанному в разделе Пример в данной заявке.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), обладают высокой аффинностью связывания с PD-1 (например, PD-1 человека или PD-1 *Cynomolgus*), например, с K_D (равновесной константой диссоциации) в диапазоне от 25 нМ или менее. Таким образом, предпочтительно, антитела согласно настоящему изобретению, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), обладают аффинностью связывания с PD-1 (например, PD-1 человека или *Cynomolgus* PD-1), которая соответствует K_D, меньшей чем 25 нМ, меньшей чем 20 нМ, меньшей чем 15 нМ или меньшей чем 10 нМ, более предпочтительно, меньшей чем 10, 9,5, 9, 8,5, 8, 7,5, 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5 или 1 нМ. Важно отметить, что антитела с такими аффинностями, как описанные выше, находятся в установленном диапазоне, который, как показали, полезен для терапии.

Например, аффинность связывания (например, K_D) антител согласно настоящему изобретению с PD-1 человека, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), может быть меньше чем 20 нМ, меньше чем 15 нМ или меньше чем 10 нМ, или меньше чем 5 нМ (например, меньше чем 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5 или 1 нМ). В некоторых вариантах реализации аффинность связывания антител согласно настоящему изобретению (например, антитела на основе 273_C12_C05 (исходного клона), например, 273_C12_C05 (исходного клона) или его варианта 1 или варианта 2) с PD-1 человека, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), может составлять 5 нМ или менее, например, составлять приблизительно 3 нМ, или приблизительно 4 нМ, или, например, составлять 3,8 нМ (K_D). В некоторых вариантах реализации аффинность связывания антител согласно настоящему изобретению (например, антитела на основе 273_C01_A12) с PD-1 человека, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), может составлять 15 нМ или менее, например, составлять приблизительно 8 нМ, 9 нМ, 10 нМ, 11 нМ или 12 нМ, или, например, составлять 10 нМ (K_D).

Аффинность связывания (например, K_D) антител согласно настоящему изобретению с PD-1 *Cynomolgus*, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), может составлять

менее чем 25 нМ, или менее чем 20 нМ, или менее чем 10 нМ (например, менее чем 9, 8, 7, 6, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5 или 1 нМ). В некоторых вариантах реализации аффинность связывания антител согласно настоящему изобретению (например, антитела на основе 273_C12_C05 (исходного клона), например, 273_C12_C05 (исходного клона) или его варианта 1 или варианта 2) с PD-1 *Cynomolgus*, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), может составлять 10 нМ или менее, например, составлять приблизительно 8 нМ или приблизительно 9 нМ, или, например, составлять 8,7 нМ (K_D). В некоторых вариантах реализации аффинность связывания антител согласно настоящему изобретению (например, антитела на основе 273_C01_A12) с PD-1 *Cynomolgus*, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), может составлять 25 нМ или менее, например, составлять приблизительно 19 нМ, 20 нМ, 21 нМ 22 нМ или 23 нМ, или, например, составлять 21 нМ (K_D).

В некоторых вариантах реализации аффинность (K_D) антител согласно настоящему изобретению к PD-1 не относящегося к человеку примата (например, PD-1 *Cynomolgus*), например, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), находится в пределах 5-кратной, предпочтительно в пределах 4-кратной, или 3-кратной, или 2,5-кратной, или 2-кратной, или от 2-кратной до 3-кратной (например, 2,3-кратной или 2,1-кратной) аффинности к PD-1 человека. В некоторых вариантах реализации аффинность связывания антител согласно настоящему изобретению (например, антитела на основе 273_C12_C05 (исходного клона), например, 273_C12_C05 (исходного клона) или его варианта 1 или варианта 2) к PD-1 *Cynomolgus*, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), находится в пределах 2,3-кратной аффинности связывания с PD-1 человека. В некоторых вариантах реализации аффинность связывания антител согласно настоящему изобретению (например, антитела на основе 273_C01_A12) с PD-1 *Cynomolgus*, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), находится в пределах 2,1-кратной аффинности связывания с PD-1 человека.

В некоторых вариантах реализации аффинность (K_D) (значение аффинности, например, в нМ) антител согласно настоящему изобретению к PD-1 не относящегося к человеку примата (например, PD-1 *Cynomolgus*), например, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), составляет от 50% до 500% от аффинности (значения аффинности, например, в нМ) к PD-1 человека. Предпочтительно, аффинность (K_D) (значение аффинности, например, в нМ) антител согласно настоящему изобретению к PD-1 не относящегося к человеку примата (например, PD-1 *Cynomolgus*), например, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), составляет от 50% до 400%, или от 50% до 300%, или от 50% до 250%, или от 50% до 200%, или от 50% до 150%, или от 50% до 100% от аффинности (значения аффинности, например, в нМ) к PD-1 человека. В некоторых предпочтительных вариантах реализации аффинность (K_D) (значение аффинности, например, в нМ) антител согласно настоящему изобретению к PD-1 не относящегося к человеку примата (например, PD-1 *Cynomolgus*), например, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), составляет от

50% до приблизительно 250% от аффинности (значения аффинности, например, в нМ) к PD-1 человека. В некоторых предпочтительных вариантах реализации аффинность (K_D) (значение аффинности, например, в нМ) антител согласно настоящему изобретению к PD-1 не относящегося к человеку примата (например, PD-1 *Cynomolgus*), например, когда они
 5 находятся в формате IgG (например, IgG₂), составляет от 50% до приблизительно 200%, от 50% до 210%, от 50% до 220%, от 50% до 230% или от 50% до 240% от аффинности (значения аффинности, например, в нМ) к PD-1 человека.

В некоторых вариантах реализации аффинность (K_D) (значение аффинности, например, в нМ) антител согласно настоящему изобретению к PD-1 не относящегося к
 10 человеку примата (например, PD-1 *Cynomolgus*), например, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), составляет по меньшей мере 100% от аффинности (значения аффинности, например, в нМ) к PD-1 человека (таким образом, в некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению обладают аффинностью к PD-1 не
 15 относящегося к человеку примата (например, PD-1 *Cynomolgus*), которая равна или ниже, чем аффинность к PD-1 человека). В некоторых вариантах реализации аффинность (K_D) (значение аффинности, например, в нМ) антител согласно настоящему изобретению к PD-1 не относящегося к человеку примата (например, PD-1 *Cynomolgus*), например, когда они
 20 находятся в формате IgG (например, IgG₂), составляет от 100% до 500% от аффинности (значения аффинности, например, в нМ) к PD-1 человека. Предпочтительно, аффинность (K_D) (значение аффинности) антител согласно настоящему изобретению к PD-1 не относящегося к человеку примата (например, PD-1 *Cynomolgus*), например, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), составляет от 100% до 400%, или от 100% до 300%, или от 100% до
 25 250%, или от 100% до 200%, или от 100% до 150% от аффинности (значения аффинности, например, в нМ) к PD-1 человека. В некоторых предпочтительных вариантах реализации аффинность (K_D) (значение аффинности, например, в нМ) антител согласно настоящему изобретению к PD-1 не относящегося к человеку примата (например, PD-1 *Cynomolgus*),
 30 например, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), составляет от 100% до 250% от аффинности (значения аффинности, например, в нМ) к PD-1 человека. В некоторых предпочтительных вариантах реализации аффинность (K_D) (значение аффинности, например, в нМ) антител согласно настоящему изобретению к PD-1 не относящегося к человеку примата (например, PD-1 *Cynomolgus*), например, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), составляет от 100% до 200%, от 100% до 210%, от 100% до 220%, от
 100% до 230% или от 100% до 240% от аффинности (значения аффинности, например, в нМ) к PD-1 человека.

35 В качестве примера, если аффинность (значение аффинности) антитела согласно настоящему изобретению к PD-1 человека составляет 3,8 нМ, и аффинность (K_D) (значение аффинности) к PD-1 не относящегося к человеку примата (например, PD-1 *Cynomolgus*),

например, когда оно находится в формате IgG (например, IgG₂), составляет от 50% до 250% от аффинности (значения аффинности) к PD-1 человека, то аффинность (значение аффинности) к PD-1 не относящегося к человеку примата (например, PD-1 *Cynomolgus*) может составлять от 1,9 нМ до 9,5 нМ.

5 Таким образом, в некоторых вариантах реализации аффинность (K_D) (значение аффинности) антител согласно настоящему изобретению к PD-1 не относящегося к человеку примата (например, PD-1 *Cynomolgus*), например, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), сравнима (или сходна, или точно соответствует, или по существу эквивалентна) с аффинностью (значением аффинности) к PD-1 человека.

10 Предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению связываются с PD-1 мыши. Аффинность связывания (K_D) антител согласно настоящему изобретению с PD-1 мыши, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), может составлять менее 10 мкМ (например, менее 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5 или 1 мкМ). В некоторых вариантах реализации аффинность связывания антител согласно настоящему изобретению (например, 15 антител на основе 273_C12_C05 (исходного клона), например, 273_C12_C05 (исходного клона) или его варианта 1 или варианта 2) с PD-1 мыши, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), может составлять 10 мкМ или менее, например, составлять приблизительно 6 мкМ, или приблизительно 7 мкМ, или, например, составлять 6,4 мкМ (K_D).

В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению 20 обладают аффинностью к PD-1 человека, которая выше, чем аффинность к PD-1 человека у антител 246A10, и/или 413E1, и/или 244C8, описанных в WO 2016/106159. Предпочтительные аффинности антител согласно настоящему изобретению обсуждаются в других местах в данной заявке.

Можно применять любой подходящий способ определения K_D . Тем не менее, 25 предпочтительно K_D определяют в анализе поверхностного плазмонного резонанса (например, анализе BIAcore) с указанными кинетическими параметрами. Подходящие и предпочтительные типы анализа ППР описаны выше. Таким образом, значения K_D , описанные выше, могут быть такими, как определили в анализе ППР, описанном выше или в других местах в данной заявке. Особенно предпочтительный способ описан в разделе Пример в 30 данной заявке.

В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению K_a (или “скорость ассоциации” или константа ассоциации) ($M^{-1} s^{-1} \times 10^5$) с PD-1 человека составляет по меньшей мере 2, предпочтительно по меньшей мере 3, или по меньшей мере 4, или по меньшей мере 5, или по меньшей мере 6. В некоторых вариантах реализации K_a 35 (или “скорость ассоциации”) ($M^{-1} s^{-1} \times 10^5$) с PD-1 человека составляет приблизительно от 2 до 10 (например, приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5,

приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9 или приблизительно 10), предпочтительно от 3 до 7. В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению (например, антител на основе 273_C12_C05 (исходного клона), например, 273_C12_C05 (исходного клона) или его варианта 1 или варианта 2) K_a (или “скорость ассоциации”) ($M^{-1} s^{-1} \times 10^5$) с PD-1 человека составляет по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3, обычно приблизительно от 3 до 5, например, приблизительно 4 (например, 3,92). В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению (например, антител на основе 273_C01_A12) K_a (или “скорость ассоциации”) ($M^{-1} s^{-1} \times 10^5$) с PD-1 человека составляет по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6, обычно приблизительно от 5 до 7, например, приблизительно 6 (например, 6,06).

В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению K_a (или “скорость ассоциации”) ($M^{-1} s^{-1}$) с PD-1 человека выше (предпочтительно значимо выше, например, статистически значимо выше, например, со значением вероятности $\leq 0,05$), чем K_a (или “скорость ассоциации”) ($M^{-1} s^{-1}$) с PD-1 человека у антитела ниволумаб (например, когда антитела находятся в формате IgG, таком как формат IgG₂). В таблице F представлены последовательности аминокислот ниволумаба (последовательности доменов VH и VL и последовательности тяжелой и легкой цепей IgG₂). В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению K_a (или “скорость ассоциации”) ($M^{-1} s^{-1}$) с PD-1 человека по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 125% по меньшей мере 150%, по меньшей мере на 175%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 350%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 450% или по меньшей мере 500% выше, чем K_a (или “скорость ассоциации”) ($M^{-1} s^{-1}$) с PD-1 человека у антитела ниволумаб. В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению K_a (или “скорость ассоциации”) ($M^{-1} s^{-1}$) с PD-1 человека до 500%, до 750% или до 1000% выше, чем K_a (или “скорость ассоциации”) ($M^{-1} s^{-1}$) с PD-1 человека у антитела ниволумаб.

Предпочтительно, у антител согласно настоящему изобретению K_a (или “скорость ассоциации”) ($M^{-1} s^{-1}$) с PD-1 человека по меньшей мере на 100%, или по меньшей мере на 150%, или по меньшей мере на 175% выше (например, на 100% - 500% выше, или на 150% - 350% выше, или на 175% - 350% выше), чем K_a (или “скорость ассоциации”) ($M^{-1} s^{-1}$) с PD-1 человека у антитела ниволумаб (например, когда антитела находятся в формате IgG, таком как формат IgG₂). В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению (например, антител на основе 273_C12_C05 (исходного клона), например, 273_C12_C05 (исходного клона) или его варианта 1 или варианта 2) K_a (или “скорость ассоциации”) ($M^{-1} s^{-1}$) с PD-1 человека по меньшей мере на 150% выше (например, на 150% - 250% выше, или на 175% - 225% выше, или на 175% - 200% выше), чем K_a (или “скорость

ассоциации”) ($M^{-1} \text{ c}^{-1}$) с PD-1 человека у антитела ниволумаб. В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению (например, антител на основе 273_C01_A12) K_a (или “скорость ассоциации”) ($M^{-1} \text{ c}^{-1}$) с PD-1 человека по меньшей мере на 300% выше (например, на 300% - 400% выше, или на 325% - 375% выше, или на 325% - 350% выше), чем K_a (или “скорость ассоциации”) ($M^{-1} \text{ c}^{-1}$) с PD-1 человека у антитела ниволумаб.

Таким образом, с другой точки зрения, у антител согласно настоящему изобретению K_a (или “скорость ассоциации”) ($M^{-1} \text{ c}^{-1}$) с PD-1 человека может быть по меньшей мере в 2 раза выше, по меньшей мере в 3 раза выше, по меньшей мере в 4 раза выше, по меньшей мере в 5 раз выше, или по меньшей мере в 6 раз выше, чем K_a (или “скорость ассоциации”) ($M^{-1} \text{ c}^{-1}$) с PD-1 человека у антитела ниволумаб (например, когда антитела находятся в формате IgG, таком как формат IgG₂). У антител согласно настоящему изобретению K_a (или “скорость ассоциации”) ($M^{-1} \text{ c}^{-1}$) с PD-1 человека в 2 - 10 раз выше, например, в 2 - 3 раза выше, в 2 - 4 раза выше, в 2 - 5 раз выше или в 2 - 6 раз выше, чем K_a (или “скорость ассоциации”) ($M^{-1} \text{ c}^{-1}$) с PD-1 человека у антитела ниволумаб (например, когда антитела находятся в формате IgG, таком как формат IgG₂).

В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению K_a (или “скорость ассоциации”) ($M^{-1} \text{ c}^{-1}$) с PD-1 человека выше (например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере на 30% выше или предпочтительно по меньшей мере на 40% выше), чем K_a с PD-1 человека у антитела 413D2, описанного в WO 2016/106159. Предпочтительные скорости ассоциации антител согласно настоящему изобретению обсуждаются в других местах в данной заявке.

В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению K_d (или “скорость диссоциации” или константа диссоциации) ($\text{c}^{-1} \times 10^{-4}$) от PD-1 человека составляет по меньшей мере 7, или по меньшей мере 10, или по меньшей мере 15, или по меньшей мере 20, или по меньшей мере 30, или по меньшей мере 40, или по меньшей мере 50, или по меньшей мере 60. В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению K_d (или “скорость диссоциации”) ($\text{c}^{-1} \times 10^{-4}$) от PD-1 человека составляет приблизительно от 10 до 70 (например, приблизительно 10, приблизительно 20, приблизительно 30, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60 или приблизительно 70). В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению (например, антител на основе 273_C12_C05 (исходного клона), например, 273_C12_C05 (исходного клона) или его варианта 1 или варианта 2) K_d (или “скорость диссоциации”) ($\text{c}^{-1} \times 10^{-4}$) от PD-1 человека составляет приблизительно от 10 до 20, например, приблизительно 13, приблизительно 14, приблизительно 15, приблизительно 16 или приблизительно 17, например, 15. В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению (например, антител на основе 273_C01_A12) K_d (или “скорость

диссоциации”) ($\text{с}^{-1} \times 10^{-4}$) от PD-1 человека составляет приблизительно от 50 и 70, например, приблизительно 60, например, 61.

В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению K_d (или “скорость диссоциации”) (с^{-1}) от PD-1 человека выше (предпочтительно значимо выше, например, статистически значимо выше, например, со значением вероятности $\leq 0,05$), чем K_d (или “скорость диссоциации”) (с^{-1}) от PD-1 человека у антитела ниволумаб (например, когда антитела находятся в формате IgG, таком как формат IgG₂). В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению K_d (или “скорость диссоциации”) (с^{-1}) от PD-1 человека по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 125% по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 175%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 500%, или по меньшей мере на 600% выше, или по меньшей мере на 700% выше, или по меньшей мере на 800% выше, или по меньшей мере на 900% выше, или по меньшей мере на 1000% выше, чем K_d (или “скорость диссоциации”) (с^{-1}) от PD-1 человека у антитела ниволумаб. В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению K_d (или “скорость диссоциации”) (с^{-1}) от PD-1 человека до 1000%, до 1500% или до 2000% выше, чем K_d (или “скорость диссоциации”) (с^{-1}) от PD-1 человека у антитела ниволумаб.

Предпочтительно, у антител согласно настоящему изобретению K_d (или “скорость диссоциации”) (с^{-1}) от PD-1 человека по меньшей мере на 100%, или по меньшей мере на 150%, или по меньшей мере на 175% выше (например, на 100% - 1500% выше, или на 150% - 1200% выше, или на 175% - 1100% выше), чем K_d (или “скорость диссоциации”) (с^{-1}) от PD-1 человека у антитела ниволумаб (например, когда антитела находятся в формате IgG, таком как формат IgG₂).

В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению (например, антител на основе 273_C12_C05 (исходного клона), например, 273_C12_C05 (исходного клона) или его варианта 1 или варианта 2) K_d (или “скорость диссоциации”) (с^{-1}) от PD-1 человека по меньшей мере на 100% выше (например, на 100% - 300% выше, или на 150% - 250% выше, или на 150% - 225% выше), чем K_d (или “скорость диссоциации”) (с^{-1}) от PD-1 человека у антитела ниволумаб (например, когда антитела находятся в формате IgG, таком как формат IgG₂).

В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению (например, антител на основе 273_C01_A12) K_d (или “скорость диссоциации”) (с^{-1}) от PD-1 человека по меньшей мере на 500% выше (например, на 500% - 1500% выше, или на 700% - 1200% выше, или на 1000% - 1200% выше), чем K_d (или “скорость диссоциации”) (с^{-1}) от PD-1

человека у антитела ниволумаб (например, когда антитела находятся в формате IgG, таком как формат IgG₂).

Таким образом, с другой точки зрения, у антител согласно настоящему изобретению K_d (или “скорость диссоциации”) (s^{-1}) от PD-1 человека может быть по меньшей мере в 2 раза выше, по меньшей мере в 3 раза выше, по меньшей мере в 4 раза выше, по меньшей мере в 5 раз выше, по меньшей мере в 6 раз выше, по меньшей мере в 7 раз выше, по меньшей мере в 8 раз выше, по меньшей мере в 9 раз выше или по меньшей мере в 10 раз выше, чем K_d (или “скорость диссоциации”) (s^{-1}) от PD-1 человека у антитела ниволумаб (например, когда антитела находятся в формате IgG, таком как формат IgG₂). У антител согласно настоящему изобретению K_d (или “скорость диссоциации”) (s^{-1}) от PD-1 человека в 2 - 15 раз выше, например, в 2 - 12 раз выше, в 2 - 10 раз выше, в 2 - 6 раз выше, в 2 - 5 раз выше, в 2 - 4 раза выше или в 2 - 3 раза выше, чем K_d (или “скорость диссоциации”) (s^{-1}) от PD-1 человека у антитела ниволумаб (например, когда антитела находятся в формате IgG, таком как формат IgG₂).

В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению K_d (или “скорость диссоциации”) ($M^{-1} s^{-1}$) от PD-1 человека выше (например, по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, или по меньшей мере на 25% выше), чем K_d от PD-1 человека у антитела 393C5, описанного в WO 2016/106159. В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению K_d (или “скорость диссоциации”) ($M^{-1} s^{-1}$) от PD-1 человека выше (например, по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, или по меньшей мере на 30%, или по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере на 50% выше), чем K_d от PD-1 человека у антитела 388D4, описанного в WO 2016/106159. Предпочтительные скорости диссоциации антител согласно настоящему изобретению обсуждаются в других местах в данной заявке.

В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению K_d (или “скорость диссоциации”) ($M^{-1} s^{-1}$) от PD-1 человека выше (например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 50%, предпочтительно по меньшей мере на 100%, или по меньшей мере на 200% выше), чем K_d от PD-1 человека у антител 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 и/или 5F4, описанных в US 2009/0217401 A1. Предпочтительные скорости диссоциации антител согласно настоящему изобретению обсуждаются в других местах в данной заявке.

K_a (или “скорость ассоциации”) или K_d (или “скорость диссоциации”) можно определить с помощью любого подходящего способа, и такие способы знакомы специалисту. Например, K_a (или “скорость ассоциации”) или K_d (или “скорость диссоциации”) можно определить в анализе поверхностного плазмонного резонанса (например, в анализе BIAcore), и подходящие и предпочтительные анализы поверхностного плазмонного резонанса описаны выше. Таким образом, описанные выше значения K_a и K_d могут быть такими, как определили

в анализе ППР, описанном выше или в других местах в данной заявке. Особенно предпочтительный анализ описан в разделе Пример в данной заявке.

Как описано выше, у предпочтительных антител согласно настоящему изобретению выше “скорость ассоциации” (K_a или константа ассоциации) и/или выше “скорость диссоциации” (K_d или константа диссоциации), чем у антитела ниволумаб. Хотя у некоторых антител согласно настоящему изобретению может быть сходная K_D при сравнении с ниволумабом, они могут отличаться по скорости ассоциации и диссоциации (K_a и/или K_d), при этом у некоторых антител согласно настоящему изобретению выше значения как скорости ассоциации, так и скорости диссоциации. На практике, отличие скоростей ассоциации и скоростей диссоциации может приводить к различиям в фармакокинетике. Например, низкая (или более низкая) скорость диссоциации может быть связана с плохим проникновением в опухоль. Без привязки к какой-либо теории, в отношении ингибирования сигнального пути антителом, более высокая скорость диссоциации может быть предпочтительна, так как одна молекула антитела с большей вероятностью диссоциирует, а затем снова свяжется с несколькими молекулами рецепторов, таким образом, потенциально запуская или блокируя большее число сигнальных событий, чем молекула антитела, очень крепко удерживаемая одной молекулой рецептора.

Антитела согласно настоящему изобретению обычно связываются с PD-1 человека. Предпочтительно, такие антитела также связываются с PD-1 обезьяны (например, с PD-1 *Cynomolgus*). Таким образом, в некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению связываются с PD-1 человека и PD-1 обезьяны. В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению связываются с PD-1 человека и PD-1 мыши. В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению связываются с PD-1 человека, и с PD-1 обезьяны, и с PD-1 мыши. Способность антитела связываться с PD-1 (например, с PD-1 человека, обезьяны или мыши) можно оценить с помощью любого подходящего способа, например, анализа ППР, анализа ELISA, анализа методом проточной цитометрии или репортерного анализа, основанного на клеточной системе, например, одного из анализов, описанных в других местах в данной заявке.

В других местах в данной заявке обсуждалось, что некоторые предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению могут связываться с обоими PD-1 человека и PD-1 обезьяны (*Cynomolgus*), или с обоими PD-1 человека и PD-1 мыши, или со всеми PD-1 человека, и PD-1 обезьяны, и PD-1 мыши. Например, антитело на основе 273_C12_C05 (исходного клона), например, 273_C12_C05 (исходного клона) или его варианта 1 или варианта 2) может обладать способностью связываться с PD-1 человека, и с PD-1 обезьяны, и с PD-1 мыши. Такая перекрестная реактивность между видами и, в частности, между людьми и видами, обычно используемыми в качестве доклинических моделей на животных

(например, мыши или обезьяны), может быть предпочтительна, так как она позволяет более эффективный переход от доклинических испытаний к клиническому применению. Например, использование антитела, которое перекрестно реагирует с нативным PD-1, присутствующим в конкретной модели на животных, означает, что результаты, полученные в данной модели, более вероятно будут отражать ситуацию в пациенте-человеке, таким образом, позволяя провести более точную оценку, например, необходимой дозировки и допуская повышенную вероятность обнаружения любых потенциально возможных или проблематичных побочных действий. Например, способность антитела согласно настоящему изобретению связываться как с PD-1 человека, так и с PD-1 обезьяны/PD-1 мыши, означает, что такие антитела можно исследовать в доклинических испытаниях токсичности, чтобы оценить нежелательные побочные действия указанного лечения и подобрать подходящие переносимые дозировки. Антитела, которые не связываются с PD-1 мыши (например, ниволумаб), нельзя использовать в сингенных моделях на мышах.

В других местах в данной заявке обсуждалось, что в некоторых предпочтительных вариантах реализации аффинность (K_D) (значение аффинности, например, в нМ) антител согласно настоящему изобретению к PD-1 не относящегося к человеку примата (например, PD-1 *Cynomolgus*), например, когда они находятся в формате IgG (например, IgG₂), сравнима (или сходна, или точно соответствует, или по существу эквивалентна) аффинности (значению аффинности, например, в нМ) к PD-1 человека. Без привязки к какой-либо теории, антитела со сходными (или сравнимыми, или точно соответствующими, или по существу эквивалентными) аффинностями к PD-1 человека и *Cynomolgus* могут быть особенно предпочтительны, так как это означает, что результаты, полученные в экспериментах на *Cynomolgus* (организме, обычно используемом в медицинских экспериментах), будут лучше отражать вероятное их поведение (например, вероятную терапевтическую эффективность) у людей.

В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению связываются с рекомбинантным PD-1 (например, рекомбинантным PD-1 человека). Рекомбинантный PD-1 человека доступен для приобретения. Рекомбинантный PD-1 (например, рекомбинантный PD-1 человека) может находиться в форме слитого белка с PD-1, например, слитого PD-1-rCD4 (rCD4 представляет собой CD4 крысы), или слитого PD-1-Fc. В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению способны связываться с PD-1 (например, рекомбинантным PD-1) в анализе ППР или в анализе ELISA, например, описанных в других местах в данной заявке (например, в разделе Пример).

В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению связываются с PD-1 в анализе ELISA. Специалисту знакомы анализы ELISA, и он легко может определить подходящие условия, чтобы оценить способность антитела связываться с PD-1 в таком анализе. Например, антитела против PD-1 (например, антитела IgG, такие как антитела

IgG₂) можно инкубировать в планшетах ELISA, покрытых антителами против Fc, так что указанное антитело будет захвачено, а затем промыть и инкубировать с PD-1 (например, биотинилированным PD-1-гCD4 человека) с последующим детектированием связанного PD-1 (например, применяя меченый европиум стрептавидин). В некоторых вариантах реализации используют низкую концентрацию антигена (PD-1), например, приблизительно 40 пМ. Как правило, антитела согласно настоящему изобретению связываются с PD-1 человека в анализе ELISA. В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению (например, антитела на основе 273_C12_C05 (исходного клона), например, 273_C12_C05 (исходного клона) или его варианта 1 или варианта 2) могут связываться с PD-1 мыши в анализе ELISA. Особенно предпочтительный анализ ELISA представлен на фигуре 2 и описан в примере в данной заявке.

Антитела согласно настоящему изобретению обычно связываются с экспрессированным на поверхности клетки PD-1, таким как экспрессированный на поверхности клетки PD-1 человека (PD-1, экспрессированный на поверхности клеток или присутствующий около или на поверхности экспрессирующих PD-1 клеток). Такие формы на поверхности клеток, таким образом, во многих случаях будут представлять нативную или природную форму PD-1 (или нативную или природную конфигурацию PD-1), например, форму, находящуюся на клетках, которые в природе экспрессируют или сверхэкспрессируют PD-1. PD-1 обычно экспрессируется на поверхности Т-клеток и про-В-клеток. В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению связываются с PD-1, экспрессированным на поверхности клеток (предпочтительно клеток млекопитающих), которые были сконструированы для конститутивной экспрессии PD-1, например, клетках Jurkat, которые были сконструированы для конститутивной экспрессии PD-1 (например, клетках Jurkat NFAT-luc2/PD-1, доступных для приобретения у Promega). Связывание с PD-1 на поверхности клеток можно оценить с помощью любых подходящих средств, и предпочтительные способы включают проточную цитометрию и репортерный анализ, основанный на клеточной системе, обсуждаемый в других местах в данной заявке. В типичном способе проточной цитометрии экспрессирующие PD-1 клетки инкубируют с исследуемым антителом против PD-1 (например, антителом IgG, таким как антитело IgG₂), и антитело, связавшееся с PD-1 на клетке, детектируют с помощью флуоресценции, например, указанное антитело флуоресцентно меченое. Такое мечение, например, можно осуществить путем инкубации смеси клеток и антител со вторичным антителом (например, меченым PE антителом против Fc), которое распознает исследуемое антитело против PD-1 и которое несет флуоресцентную метку. Соответственно, если исследуемое антитело против PD-1 связывается с PD-1 на поверхности клетки, указанная клетка становится флуоресцентно меченой, и такие клетки и, следовательно, антитела, которые обладают способностью связываться с PD-1 на поверхности клетки, можно легко обнаружить, применяя проточный

цитометр. Особенно предпочтительный способ проточной цитометрии описан в примере в данной заявке. Другой способ тестирования способности антитела связываться с PD-1 на поверхности клетки представляет собой иммуногистохимию.

Обычно, антитела согласно настоящему изобретению ингибируют (или блокируют) взаимодействие между PD-1 и PD-L1. Предпочтительно, ингибирование представляет собой значимое ингибирование, например, статистически значимое ингибирование, например, со значением вероятности $\leq 0,05$. В некоторых вариантах реализации антитела согласно изобретению ингибируют (или блокируют) взаимодействие между PD-1 и PD-L1 по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или по меньшей мере на 99,5% (например, приблизительно на 99,5%). Обычно, такой % ингибирования указывают по сравнению с контрольным анализом или контрольным уровнем, например, контрольным анализом или контрольным уровнем в отсутствие антитела (антитела против PD-1) (например, отрицательным контролем или фоновым уровнем или анализом). Таким образом, 0% уровень ингибирования (контроль) (или наоборот, 100% или максимальный уровень взаимодействия) обычно представляет собой уровень в отсутствие антитела (антитела против PD-1).

В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению ингибируют (или блокируют) взаимодействие между PD-1 и PD-L1, если их применяют при концентрации, составляющей по меньшей мере 0,1 нМ, например, по меньшей мере 0,2 нМ, по меньшей мере 0,3 нМ, по меньшей мере 0,4 нМ, по меньшей мере 0,5 нМ, по меньшей мере 1 нМ, по меньшей мере 2 нМ, по меньшей мере 3 нМ, по меньшей мере 4 нМ, по меньшей мере 5 нМ, по меньшей мере 10 нМ, по меньшей мере 15 нМ, по меньшей мере 20 нМ, по меньшей мере 25 нМ, по меньшей мере 50 нМ, по меньшей мере 100 нМ, по меньшей мере 250 нМ или по меньшей мере 500 нМ. В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению ингибируют (или блокируют) взаимодействие между PD-1 и PD-L1, когда их применяют при концентрации, составляющей 1 нМ или менее, или 10 нМ или менее, или 50 нМ или менее, или 100 нМ или менее, или 250 нМ или менее, или 500 нМ или менее (например, от 0,5 нМ до 50 нМ, или от 1 нМ до 50 нМ, или от 0,5 нМ до 5 нМ, или от 0,5 нМ до 10 нМ, или от 1 нМ до 5 нМ, или от 1 нМ до 10 нМ). Например, в предпочтительных вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению могут ингибировать взаимодействие между PD-1 и PD-L1 по меньшей мере на 60%, предпочтительно по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 75% (например, на от 60% до 100%, или от 60% до 99%, или от 70% до 85%, или от 75% до 80%), если их применяют при концентрации, составляющей по меньшей мере 0,5 нМ (например, если применяют при 0,5 нМ). В других предпочтительных вариантах реализации антитела согласно настоящему

изобретению могут ингибировать взаимодействие между PD-1 и PD-L1 по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, или даже по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% (например, от 85% до 100%, или от 85% до 99%, или от 95% до 99% или от 95% до 100%), если их
 5 применяют при концентрации, составляющей по меньшей мере 1 нМ (например, если применяют при 1 нМ).

Способность антитела ингибировать (или блокировать) взаимодействие между PD-1 и PD-L1 можно определить (или оценить), применяя любой подходящий анализ (как правило, анализ *in vitro*), например, конкурентный анализ, например, анализ, в котором исследуемое
 10 антитело против PD-1 конкурирует с PD-L1 за связывание с PD-1. Можно применять любой подходящий конкурентный анализ (например, конкурентный анализ на основе ELISA). В предпочтительном варианте реализации антитела согласно настоящему изобретению ингибируют (или блокируют) взаимодействие между PD-1 и PD-L1 в следующем типе конкурентного анализа.

15 PD-L1 или содержащую PD-L1 молекулу или слитый белок (например, PD-L1-rCD4) иммобилизуют (или захватывают) на твердой подложке (например, поверхности планшета ELISA), например, посредством антитела, которым была покрыта твердая подложка, которое распознает PD-L1 или содержащую PD-L1 молекулу или слитый белок (например, антитела против rCD4, которое распознает PD-L1-rCD4). Содержащую PD-1 молекулу или слитый белок
 20 (например, PD-1-Fc) смешивают в присутствии (например, серии концентраций) или отсутствие исследуемого антитела против PD-1 (например, в течение приблизительно 30 минут). После промывки твердой подложки (например, поверхности планшета ELISA) для удаления избытка не связавшегося PD-L1 или содержащей PD-L1 молекулы или слитого белка (например, PD-L1-rCD4), предварительно смешанную содержащую PD-1 молекулу или
 25 слитый белок (например, смесь PD-1-Fc/антитело против PD-1) добавляют к твердой подложке (например, поверхности планшета ELISA, содержащей иммобилизованный PD-L1) и инкубируют (например, в течение приблизительно одного часа). Если исследуемое антитело против PD-1 связывается с эпитопом на PD-1, который отвечает за связывание PD-1 с PD-L1 (или участвует в нем), взаимодействие между PD-1 и PD-L1 будет ингибироваться (или
 30 блокироваться или предотвращаться). После этапа дополнительной промывки содержащую PD-1 молекулу или слитый белок (например, PD-1-Fc), связавшийся с иммобилизованным PD-L1 (или содержащей PD-L1 молекулой или слитым белком, например, PD-L1-rCD4), детектируют, применяя меченое (например, меченое биотином) антитело, которое распознает содержащий PD-1 слитый белок (например, антитело против Fc-биотин
 35 (биотинилированное антитело против Fc), которое распознает PD-1-Fc), и детектирующий реагент, который распознает меченое антитело (например, меченый европием стрептавидин, который распознает антитело против Fc-биотин).

В таком конкурентном анализе максимальный уровень взаимодействия между PD-1 и PD-L1 (максимальное взаимодействие, или 100% взаимодействие, или 100% уровень взаимодействия) можно определить как уровень (например, уровень детектируемого сигнала) в присутствии PD-L1 (или содержащей PD-L1 молекулы или слитого белка) и содержащей PD-1 молекулы или слитого белка, но в отсутствие исследуемого антитела против PD-1 (например, PD-1 ингибирующего или блокирующего антитела). Уровень максимального блокирования или уровень максимального ингибирования (максимальное блокирование или ингибирование, или 100% блокирование или ингибирование, или 100% уровень блокирования или 100% уровень ингибирования) можно определить как уровень сигнала, детектируемого в отсутствие содержащей PD-1 молекулы или слитого белка. Уровень взаимодействия (например, уровень детектированного сигнала) в присутствии исследуемого антитела против PD-1, который меньше, чем максимальный уровень взаимодействия, описанный выше, свидетельствует о том, что антитело против PD-1 ингибирует (или блокирует) взаимодействие между PD-1 и PD-L1.

Предпочтительные % ингибирования взаимодействия между PD-1 и PD-L1 (например, при определенных концентрациях антитела), описанные выше, предпочтительно такие, как определяют в типе конкурентного анализа (конкурентного анализа на основе ELISA), описанного выше и в других местах в данной заявке.

В особенно предпочтительном варианте реализации антитела согласно настоящему изобретению ингибируют (или блокируют) взаимодействие между PD-1 и PD-L1, что определяют с помощью конкурентного анализа, в котором

- Планшет ELISA (например, черный 96-луночный иммуносорбционный планшет) покрывают в течение ночи антителом против rCD4 при 4°C;
- Планшет ELISA затем трижды промывают ФБР, блокируют путем добавления 3% (масса/объем) сухого молока в ФБР (ФБР-М) (например, 200 мкл) и инкубируют в течение одного часа при комнатной температуре;
- Планшет ELISA трижды промывают ФБР, а затем добавляют 5 мкг/мл PD-L1-rCD4 в ФБР-М (например, 50 мкл) и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре;
- Планшет ELISA трижды промывают ФБР-Т (0,1% Tween-20, ФБР) и трижды ФБР;
- В отдельном планшете PD-1-Fc (например, 0,8 нМ) смешивают в присутствии (например, серии концентраций) или отсутствие антитела против PD-1 (исследуемого антитела, которое связывается с PD-1) с ФБР-М и инкубируют в течение 30 минут;

- Смесь (предварительно приготовленную смесь) из предыдущего этапа (смесь PD-1-Fc/антитело против PD-1 или PD-1-Fc, который смешали в отсутствие антитела против PD-1) добавляют в планшет ELISA и инкубируют в течение 1 часа;
- 5 • Планшет ELISA затем трижды промывают ФБР-Т и трижды ФБР;
- Планшет ELISA затем инкубируют в течение 1 часа с 0,5 мкг/мл биотинилированного антитела против Fc (например, биотинилированного антитела против Fc человека) в ФБР-М;
- Планшет ELISA затем трижды промывают ФБР-Т и трижды ФБР;
- 10 • Планшет ELISA затем инкубируют в течение 30 минут с 0,5 мкг/мл меченого европием стрептавидина в ФБР-М;
- Планшет ELISA затем трижды промывают ФБР-Т и трижды ФБР;
- Планшет ELISA затем инкубируют с детектирующим реагентом на основе европия (например, с усиливающим раствором DELFIA, доступным для приобретения от Perkin Elmer);
- 15 • Планшеты ELISA затем прочитывают (детектируют сигнал) с помощью спектрофотометра для прочтения планшетов (например, возбуждение на 340 нм, испускание на 615 нм);

и в котором максимальный уровень взаимодействия между PD-1 и PD-L1 (максимальное взаимодействие, или 100% взаимодействие, или 100% уровень взаимодействия) определяют как уровень (например, уровень детектированного сигнала) в присутствии PD-L1-rCD4 и PD-1-Fc, но в отсутствие антитела против PD-1 (например, блокирующего PD-1 антитела), при этом уровень взаимодействия в присутствии антитела против PD-1, который меньше, чем максимальный уровень взаимодействия, описанный выше, свидетельствует о том, что антитело против PD-1 ингибирует (или блокирует) взаимодействие между PD-1 и PD-L1. Как правило, уровень максимального блокирования или уровень максимального ингибирования (максимальное блокирование или ингибирование, или 100% блокирование или ингибирование, или 100% уровень блокирования или 100% уровень ингибирования) определяют как уровень (например, уровень детектированного сигнала) в отсутствие PD-1-Fc. Особенно предпочтительный конкурентный анализ описан в разделе Пример в данной заявке и изображен на фигуре 4А.

Предпочтительные % ингибирования взаимодействия между PD-1 и PD-L1 (например, при определенных концентрациях антитела), описанные выше, предпочтительно такие, как определяют в особенно предпочтительном типе конкурентного анализа (конкурентного анализа на основе ELISA), описанного выше и в других местах в данной заявке.

В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению (например, антитела IgG, такие как антитела IgG₂) ингибируют (или блокируют) взаимодействие между PD-1 и PD-L1 в большей степени, чем антитело ниволумаб (например, в формате IgG, таком как IgG₂). Другими словами, в некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению более эффективно, чем антитело ниволумаб, ингибируют (или блокируют) взаимодействие между PD-1 и PD-L1. В некоторых предпочтительных вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению ингибируют (или блокируют) взаимодействие между PD-1 и PD-L1 в большей степени, чем антитело ниволумаб, если указанные антитела применяют при низких (или более низких концентрациях), например, если применяют при концентрации в диапазоне от 0,1 нМ до 2 нМ (например, 0,1, 0,2, 0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2 нМ). В некоторых предпочтительных вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению ингибируют (или блокируют) взаимодействие между PD-1 и PD-L1 в большей степени, чем антитело ниволумаб, если указанные антитела применяют в диапазоне концентраций от 0,5 нМ до 1,5 нМ (например, если применяют при 0,5 нМ или 1 нМ). Например, в предпочтительном варианте реализации ингибирование (или блокирование) взаимодействия между PD-1 и PD-L1 антителами согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 10%, или по меньшей мере на 20%, или по меньшей мере на 30%, предпочтительно по меньшей мере на 40%, более предпочтительно по меньшей мере на 50% выше (например, приблизительно на 10% - 60% выше, или приблизительно на 25% - 60% выше, или приблизительно на 50% - 60% выше), чем антителом ниволумаб, если указанные антитела применяют при концентрации 0,5 нМ. В другом предпочтительном варианте реализации ингибирование (или блокирование) взаимодействия между PD-1 и PD-L1 антителами согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 10%, или по меньшей мере 20%, (например, приблизительно на 10% - 20%) выше, чем антителом ниволумаб, если указанные антитела применяют при концентрации 1 нМ. Предпочтительные % ингибирования взаимодействия между PD-1 и PD-L1 (например, при определенных концентрациях антитела), описанные выше, предпочтительно такие, как определяют в особенно предпочтительном типе конкурентного анализа (конкурентного анализа на основе ELISA), описанного выше и в других местах в данной заявке.

Без привязки к какой-либо теории, способность предпочтительных антител согласно настоящему изобретению проявлять хорошее ингибирование взаимодействия PD-1 и PD-L1 при низких концентрациях антитела может быть предпочтительной, например, в отношении меньших побочных действий у пациента по сравнению с применением высоких (или более высоких) концентраций антитела или уменьшения количества (дозы) антитела, необходимого для наблюдения терапевтического действия, или улучшения фармакокинетических свойств.

В предпочтительном варианте реализации антитела согласно настоящему изобретению ингибируют (или блокируют) взаимодействие между PD-1 и PD-L1, что определяют с помощью репортерного анализа, основанного на клеточной системе, или репортерной системы, основанной на клеточной системе. Предпочтительно ингибирование представляет собой значимое ингибирование, например, статистически значимое ингибирование, например, со значением вероятности $\leq 0,05$. В таком анализе или системе предусмотрено считывание активности PD-1 (например, считывание вызванной или опосредованной PD-1 активности PD-L1). Например, в репортерном анализе, основанном на клеточной системе, могут использовать репортер (например, репортер на основе люциферазы), который реагирует на активность PD-1/PD-L1 (например, реагирует, то есть, активируется или подавляется, в результате взаимодействия между PD-1 и PD-L1).

В предпочтительном репортерном анализе или системе, основанных на клеточной системе, применяют две линии клеток. В таком анализе или системе одна линия клеток представляет собой линию клеток (например, линию клеток HEK293), экспрессирующих (например, стабильно экспрессирующих) PD-L1 и комплекс, активирующий Т-клеточный рецептор. Другая линия клеток представляет собой линию клеток (например, линию клеток Jurkat), экспрессирующих (например, стабильно экспрессирующих) PD-1, Т-клеточные рецепторы (комплексы Т-клеточных рецепторов) и репортер на основе люциферазы, который находится под контролем промотора, который реагирует на передачу сигналов через Т-клеточный рецептор (TCR) (например, репортер на основе люциферазы, который находится под контролем промотора NFAT; промотор NFAT активируется передачей сигналов через TCR). Предпочтительно в репортерном анализе или системе, основанных на клеточной системе, применяют линию клеток HEK293, экспрессирующих PD-L1 и комплекс, активирующий Т-клеточные рецепторы, и линию клеток Jurkat, экспрессирующую PD-1, Т-клеточные рецепторы (комплексы Т-клеточных рецепторов) и репортер на основе люциферазы, который находится под контролем промотора (предпочтительно NFAT), который реагирует на передачу сигналов через Т-клеточный рецептор (TCR). Особенно предпочтителен доступный для приобретения репортерный анализ PD-1/PD-L1, основанный на клеточной системе, от Promega, в котором используют стабильную линию клеток Jurkat NFAT-luc2/PD-1 GloResponse™ (CS187102) и клетки PD-L1 Thaw-and-Use (CS178103).

В описанных выше репортерной системе или анализе, основанных на клеточной системе, когда две указанные линии клеток совместно культивируют, взаимодействие между PD-1 и PD-L1 ингибирует (или блокирует, или предотвращает) передачу сигналов через TCR (передачу сигналов через TCR, происходящую в результате взаимодействия между Т-клеточным рецептором на одной линии клеток и TCR-активирующим комплексом, присутствующим на другой линии клеток) и, таким образом, ингибирует (или блокирует, или подавляет) опосредованную промотором активность люциферазы. Присутствие (или

добавление) антитела против PD-1, которое ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1, ингибирует (или блокирует, или снимает) опосредованное PD-1/PD-L1 ингибирование передачи сигналов через TCR и приводит к (повышенной) активности люциферазы.

Таким образом, в особенно предпочтительном варианте реализации антитела согласно настоящему изобретению ингибируют (или блокируют) взаимодействие между PD-1 и PD-L1, что определяют с помощью репортерного анализа, основанного на клеточной системе, или репортерной системы, основанной на клеточной системе, в которой

- Клетки HEK293, экспрессирующие PD-L1 и экспрессирующие активирующий TCR комплекс (например, Promega, CS178103), высевают в 96-луночный аналитический планшет (например, в 90% HAM'S F-12, 10% эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС)), например, в объеме 100 мкл и инкубируют в течение от 16 до 20 часов при 37°C, 5% CO₂;
- Клетки Jurkat, экспрессирующие PD-1, экспрессирующие комплексы TCR и несущие репортер на основе люциферазы, который находится под контролем промотора NFAT (например, Promega, CS187102), добавляют в аналитическую среду (например, 90% RPMI1640, 1% ЭБС, например, 5,9 мл аналитической среды) (клетки Jurkat можно разморозить и добавить в аналитическую среду на следующий день после посева клеток HEK293);
- Аналитический планшет, содержащий прикрепившиеся клетки HEK293, вынимают из термостата и удаляют среды (например, с помощью пипетки и переворачивания планшета на бумажное полотенце);
- 40 мкл аналитических сред, содержащих антитело (исследуемое антитело против PD-1) (например, серию концентраций) добавляют в планшет (лунки планшета), содержащий прикрепившиеся клетки HEK293, а затем добавляют 40 мкл смеси клеток Jurkat;
- Планшет инкубируют в течение 6 часов при 37°C, 5% CO₂;
- Активность люциферазы определяют (например, применяя люциферазный реагент/субстрат, такой как реагент BioGlo от Promega, G7940, и спектрофотометр для прочтения планшетов, например, BMG pherastar).

В некоторых вариантах реализации у антител согласно настоящему изобретению EC₅₀ (например, для ингибирования (или блокирования) взаимодействия между PD-1 и PD-L1) составляет 100 нМ или менее, или 75 нМ или менее, или 50 нМ или менее, или 40 нМ или менее, или 30 нМ или менее, или 20 нМ или менее, или 10 нМ или менее. Предпочтительно EC₅₀ составляет 30 нМ или менее, более предпочтительно, 20 нМ или менее, или 15 нМ или менее, или 14 нМ или менее, или 13 нМ или менее, или 12 нМ или менее, или 11 нМ или менее, или 10 нМ или менее. В некоторых вариантах реализации EC₅₀ составляет от 0,1 нМ

до 20 нМ, или от 0,5 нМ до 15 нМ, например, от 1 нМ до 15 нМ, или от 5 нМ до 15 нМ, или от 9 нМ до 12 нМ. В некоторых вариантах реализации EC_{50} составляет приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14 или
5 приблизительно 15 нМ. Например, EC_{50} может составлять 9,35 нМ или 11,7 нМ.

Предпочтительные значения EC_{50} , описанные выше, предпочтительно такие, какие определили в репортерном анализе, основанном на клеточной системе (например, в предпочтительном или особенно предпочтительном репортерном анализе, основанном на клеточной системе), описанном выше или в разделе Пример.

10 В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению обладают одним или более, предпочтительно двумя или более, или тремя или более, или четырьмя или более, или наиболее предпочтительно всеми функциональными свойствами, описанными в данной заявке.

По всему тексту настоящей заявки термины в единственном числе используют в том
15 смысле, что они означают «по меньшей мере один», «по меньшей мере первый», «один или более» или «множество» упомянутых компонентов или этапов, за исключением случаев, в которых для них конкретно установлен верхний предел. Следовательно, «антитело» в данной заявке означает «по меньшей мере первое антитело». Пригодные пределы и параметры комбинаций, например, количеств любого отдельного агента, будут известны средним
20 специалистам в данной области в свете настоящего описания.

Кроме того, когда в данной заявке используют термины “включают”, “включает”, “обладает”, или “обладающий”, или другие эквивалентные термины, то в некоторых более конкретных вариантах реализации данные термины включают термин “состоит из”, или “по существу состоит из”, или другие эквивалентные термины.

25 Молекулы нуклеиновых кислот, включающие последовательности нуклеотидов, которые кодируют антитела согласно настоящему изобретению, описанные в данной заявке, или их части или фрагменты, или молекулы нуклеиновых кислот, по существу гомологичные им, образуют дополнительные аспекты настоящего изобретения.

Предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот представляют собой такие
30 молекулы, которые кодируют область VH антитела согласно настоящему изобретению (например, такие, которые кодируют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, или 21, или 39, или 57, такие как последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1, или 19, или 37, или 55, соответственно). Другие предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот представляют собой такие молекулы, которые кодируют область VL антитела согласно
35 настоящему изобретению (например, такие, которые кодируют последовательности,

представленные в SEQ ID NO: 4, или 22, или 40, или 58, такие как последовательности, представленные в SEQ ID NO: 2, или 20, или 38, или 56, соответственно).

Таким образом, предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот включают последовательности, которые кодируют вариабельную область тяжелой цепи (VH) с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 3, 21, 39 или 57 (которую предпочтительно кодирует последовательность SEQ ID NO: 1, 19, 37 или 55), и/или включают последовательности, которые кодируют вариабельную область легкой цепи (VL) с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 4, 22, 40, или 58 (которую предпочтительно кодирует последовательность SEQ ID NO: 2, 20, 38 или 56).

Также предпочтительны нуклеиновые кислоты, которые кодируют следующие комбинации: последовательности SEQ ID NO: 3 и 4; или последовательности SEQ ID NO: 21 и 22; или последовательности SEQ ID NO 39 и 40; или последовательности SEQ ID NO 57 и 58. Также предпочтительны молекулы нуклеиновых кислот, которые включают следующие комбинации: последовательности SEQ ID NO: 1 и 2; или последовательности SEQ ID NO: 19 и 20; или последовательности SEQ ID NO: 37 и 38; или последовательности SEQ ID NO: 55 и 56.

Другие предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот включают последовательности, которые кодируют формы IgG (например, формы IgG₂) антител согласно настоящему изобретению, например, описанные в таблицах A, B, C и D в данной заявке (тяжелые цепи и легкие цепи). Таким образом, предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот представляют собой такие молекулы, которые кодируют тяжелую цепь антитела согласно настоящему изобретению (например, такие, которые кодируют последовательность SEQ ID NO: 85, 89, 93 или 97, такие как последовательности, представленные в SEQ ID NO: 87, 91, 95 или 99 соответственно) и/или которые кодируют легкую цепь антитела (например, такие, которые кодируют последовательность SEQ ID NO: 86, 90, 94, или 98, такие как последовательности, представленные в SEQ ID NO: 88, 92, 96, или 100 соответственно).

Термин «по существу гомологичный» в данной заявке применительно к последовательности аминокислот или последовательности нуклеиновой кислоты включает последовательности, по меньшей мере на 65%, 70% или 75%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, и еще более предпочтительно по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичные описанной последовательности аминокислот или последовательности нуклеиновой кислоты. По существу гомологичные последовательности согласно настоящему изобретению, следовательно, содержат одну или множество замен оснований или аминокислот (добавлений, замен, вставок или делеций) в последовательностях согласно настоящему изобретению. На уровне аминокислот предпочтительные по существу гомологичные последовательности содержат до 5, например, только 1, 2, 3, 4 или 5, предпочтительно 1, 2 или 3, более предпочтительно 1 или 2 измененные

аминокислоты, в одной или более из каркасных областей и/или в одном или более из CDR, составляющих последовательности согласно настоящему изобретению. Указанные замены могут быть на консервативные или неконсервативные аминокислоты. Предпочтительно указанные изменения представляют собой консервативные замены аминокислот.

5 В некоторых вариантах реализации, если данная исходная последовательность относительно короткая (например, длиной пять аминокислот), то в последовательностях, по существу гомологичных указанной последовательности, может присутствовать меньшее количество замен аминокислот, по сравнению с количеством замен аминокислот, которое необязательно можно сделать в последовательности, по существу гомологичной более

10 длинной исходной последовательности. Например, в некоторых вариантах реализации последовательность, по существу гомологичная исходной последовательности CDR1 VH, в соответствии с настоящим изобретением, например, исходной последовательности CDR1 VH, которая в некоторых вариантах реализации может состоять из пяти аминокислотных остатков, предпочтительно содержит 1 или 2 (более предпочтительно 1) измененные

15 аминокислоты по сравнению с исходной последовательностью. Соответственно, в некоторых вариантах реализации количество измененных аминокислот в по существу гомологичных последовательностях (например, в по существу гомологичных последовательностях CDR) может зависеть от длины данной исходной последовательности CDR. Например, могут присутствовать различные количества измененных аминокислот в зависимости от длины

20 данной исходной последовательности CDR, чтобы достичь конкретного % идентичности последовательностей в CDR, например, идентичности последовательностей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или от 99%.

Можно применять обычные в данной области способы, такие как сканирующий аланином мутагенез и/или анализ кристаллической структуры комплекса антиген-антитело,

25 чтобы определить, какие аминокислотные остатки в CDR не вносят вклад или не вносят значительный вклад в связывание антигена и, следовательно, являются хорошими кандидатами на изменение или замену в вариантах реализации настоящего изобретения, включающих по существу гомологичные последовательности.

Термин «по существу гомологичный» также включает модификации или химические

30 эквиваленты последовательностей аминокислот и нуклеотидов согласно настоящему изобретению, которые осуществляют по существу такую же функцию, что и белки или молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению по существу таким же образом. Например, любое по существу гомологичное антитело должно сохранять способность связываться с PD-1, как описано выше. Предпочтительно, любое по существу

35 гомологичное антитело должно сохранять одну или более (или все) из функциональных способностей исходного антитела.

Предпочтительно, любое по существу гомологичное антитело должно сохранять способность специфично связывать тот же эпитоп PD-1, который распознается обсуждаемым антителом, например, тот же эпитоп, который распознается доменами CDR согласно настоящему изобретению или доменами VH и VL согласно настоящему изобретению, описанными в данной заявке. Таким образом, предпочтительно любое по существу гомологичное антитело должно сохранять способность конкурировать с одним или более из различных антител согласно настоящему изобретению (например, 273_C12_C05 (исходным клоном), 273_C12_C05 (вариантом 1), 273_C12_C05 (вариантом 2) или 273_C01_A12) за связывание с PD-1. Связывание с тем же эпитопом/антигеном можно легко проверить с помощью способов, хорошо известных и описанных в данной области, например, применяя анализы связывания, например, конкурентный анализ. Сохранение других функциональных свойств также можно легко проверить с помощью способов, хорошо известных и описанных в данной области или в данной заявке.

Таким образом, для специалиста в данной области очевидно, что можно применять анализ связывания для проверки того, обладают ли «по существу гомологичные» антитела такими же специфичностями связывания, как и антитела и фрагменты антител согласно настоящему изобретению, например, такие анализы связывания, как конкурентный анализ или анализ ELISA, описанные в других местах в данной заявке. Анализ BIAcore также можно легко применять, чтобы установить, могут ли «по существу гомологичные» антитела связываться с PD-1. Специалисту будут известны другие подходящие способы и варианты анализа.

Ниже указано, что конкурентный анализ связывания можно применять для проверки того, сохраняют ли «по существу гомологичные» антитела способность специфично связывать по существу тот же эпитоп PD-1, который распознается антителами согласно настоящему изобретению (например, 273_C12_C05 (исходным клоном), 273_C12_C05 (вариантом 1), 273_C12_C05 (вариантом 2) или 273_C01_A12), или обладают ли способностью конкурировать с одним или более из различных антител согласно настоящему изобретению (например, 273_C12_C05 (исходным клоном), 273_C12_C05 (вариантом 1), 273_C12_C05 (вариантом 2) или 273_C01_A12). Описанный ниже способ представляет собой лишь один пример подходящего конкурентного анализа. Специалисту будут известны другие подходящие способы и варианты.

В типичном конкурентном анализе оценивают связывание различных эффективных концентраций антител согласно настоящему изобретению с PD-1 в присутствии изменяющихся концентраций исследуемого антитела (например, по существу гомологичного антитела). Затем можно оценить степень ингибирования связывания, вызванного исследуемым антителом. Повышение конкурентирования исследуемого антитела с антителом согласно настоящему изобретению при возрастании концентраций (т.е., возрастающие концентрации исследуемого антитела приводят к соответствующему снижению степени

связывания антитела согласно настоящему изобретению с PD-1) свидетельствует о связывании по существу с тем же эпитопом. Предпочтительно, исследуемое антитело значительно уменьшает количество антитела согласно настоящему изобретению, которое связывается с PD-1. Предпочтительно, исследуемое антитело уменьшает количество антитела согласно настоящему изобретению, которое связывается с PD-1, по меньшей мере на приблизительно 95%. Можно применять анализ ELISA и анализ методом проточной цитометрии для оценки ингибирования связывания в таком конкурентном анализе, но другие подходящие методики будут хорошо известны специалисту в данной области.

В некоторых вариантах реализации предпочтительны “по существу гомологичные” антитела, которые сохраняют способность специфично связывать по существу такой же (или такой же) эпитоп PD-1, который распознается антителами согласно настоящему изобретению (например, 273_C12_C05 (исходным клоном), 273_C12_C05 (вариантом 1), 273_C12_C05 (вариантом 2) или 273_C01_A12), или которые обладают способностью конкурировать с одним или более из различных антител согласно настоящему изобретению (например, 273_C12_C05 (исходным клоном), 273_C12_C05 (вариантом 1), 273_C12_C05 (вариантом 2) или 273_C01_A12).

Термин «конкурирующие антитела» в данной заявке относится к антителам, которые связываются с практически, по существу или фактически таким же, или даже таким же, эпитопом, как и «исходное антитело». «Конкурирующие антитела» включают антитела с перекрывающимися специфичностями к эпитопу. Конкурирующие антитела, следовательно, способны эффективно конкурировать с исходным антителом за связывание с PD-1. Предпочтительно, конкурирующее антитело может связываться с тем же эпитопом, что и исходное антитело. С другой точки зрения, конкурирующее антитело предпочтительно обладает такой же специфичностью к эпитопу, как и исходное антитело.

«Исходные антитела» в данной заявке представляют собой антитела, которые могут связываться с PD-1 в соответствии с настоящим изобретением, которые предпочтительно содержат домен VH и VL, описанный в данной заявке, более предпочтительно VH с последовательностью SEQ ID NO: 3 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 4, или VH с последовательностью SEQ ID NO: 21 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 22, или VH с последовательностью SEQ ID NO: 39 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 40, или VH с последовательностью SEQ ID NO: 57 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 58. Наиболее предпочтительные исходные антитела выбраны из 273_C12_C05 (исходного клона), 273_C12_C05 (варианта 1), 273_C12_C05 (варианта 2) или 273_C01_A12.

Теперь идентификация одного или более конкурирующих антител представляет собой простую техническую задачу, когда были предложены исходные антитела, такие как 273_C12_C05 (исходный клон), 273_C12_C05 (вариант 1), 273_C12_C05 (вариант 2) или 273_C01_A12. Так как определение идентификации конкурирующих антител приведено при

сравнении с исходным антителом, очевидно, что фактическое определение эпитопа, с которым связывается любое или оба антитела, ни в коем случае не требуется для идентификации конкурирующего антитела. Тем не менее, при желании можно осуществить картирование эпитопов, применяя стандартные методики.

5 По существу гомологичные последовательности белков согласно настоящему изобретению содержат, без ограничения, консервативные замены аминокислот, или, например, изменения, которые не влияют на домены VH, VL или CDR антител, например, антител, в которые добавили последовательности метки, токсины или другие компоненты, которые не вносят вклад в связывание антигена, или изменения для преобразования одного

10 типа или формата молекулы или фрагмента антитела в другой тип или формат молекулы или фрагмента антитела (например, преобразование Fab в scFv или целое антитело, или наоборот), или преобразование молекулы антитела в конкретный класс или подкласс молекулы антитела (например, преобразование молекулы антитела в IgG или его подкласс, например, в IgG₂).

15 «Консервативная замена аминокислот» в данной заявке представляет собой такую замену, при которой аминокислотный остаток заменяют на другой аминокислотный остаток, содержащий сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, содержащих сходные боковые цепи, определены в данной области, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая

20 кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, глицин, цистеин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан,

25 гистидин).

Гомологию можно оценить с помощью любого удобного способа. Тем не менее, для определения степени гомологии между последовательностями пригодны компьютерные программы, которые осуществляют выравнивания множества последовательностей, например, Clustal W (Thompson, Higgins, Gibson, *Nucleic Acids Res.*, 22:4673-4680, 1994). При

30 необходимости, алгоритм Clustal W можно применять вместе с матрицей замен BLOSUM 62 (Henikoff и Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915–10919, 1992) и штрафом за открытие гэпа, равным 10, и штрафом за продление гэпа, равным 0,1, так что получают совпадение между двумя последовательностями высшего порядка, при этом в выравнивании участвует по меньшей мере 50% общей длины одной из последовательностей. Другие способы, которые

35 можно применять для выравнивания последовательностей, представляют собой способ выравнивания Needleman и Wunsch (Needleman и Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970) с изменениями от Smith и Waterman (Smith и Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981), так что

получают совпадение между двумя последовательностями высшего порядка и определяют количество идентичных между двумя последовательностями аминокислот. Другие способы вычисления процента идентичности между двумя последовательностями аминокислот, как правило, известны в данной области и включают, например, описанные Carillo и Lipton (Carillo и Lipton, *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073, 1988) и описанные в *Computational Molecular Biology*, Lesk, ред. Oxford University Press, Нью-Йорк, 1988, *Biocomputing: Informatics and Genomics Projects*.

Как правило, для таких расчетов будут использовать компьютерные программы. Программы, которые сравнивают и выравнивают пары последовательностей, такие как ALIGN (Myers и Miller, *CABIOS*, 4:11-17, 1988), FASTA (Pearson и Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444-2448, 1988; Pearson, *Methods in Enzymology*, 183:63-98, 1990) и Gapped BLAST (Altschul и др., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402, 1997), BLASTP, BLASTN или GCG (Devereux, Haeberli, Smithies, *Nucleic Acids Res.*, 12:387, 1984) также пригодны для данной цели. Более того, сервер Dali в Европейском институте биоинформатики предлагает выравнивания белковых последовательностей на основании их структуры (Holm, *Trends in Biochemical Sciences*, 20:478-480, 1995; Holm, *J. Mol. Biol.*, 233:123-38, 1993; Holm, *Nucleic Acid Res.*, 26:316-9, 1998).

С целью предоставления ориентира, последовательности согласно настоящему изобретению, гомологичные, идентичные и т.д. на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или от 99%, можно определить, применяя программу ALIGN с параметрами по умолчанию (например, доступную в Интернете на сетевом сервере GENESTREAM, IGH, Монпелье, Франция).

В следующем описании композиций, иммуноконъюгатов, фармацевтических средств, комбинаций, коктейлей, наборов, первого и второго медицинского применения и всех способов в соответствии с настоящим изобретением термины «антитело» и «иммуноконъюгат», или его связывающая антиген область или фрагмент, если конкретно не указано или не ясно из научной терминологии иное, относятся к диапазону антител против PD-1, а также к конкретным антителам 273_C12_C05 (исходному клону), 273_C12_C05 (варианту 1), 273_C12_C05 (варианту 2) и 273_C01_A12.

Термины «антитело» и «иммуноглобулин» в данной заявке относятся в широком смысле к любому иммунологическому связывающему агенту, который содержит связывающий антиген домен (например, связывающий антиген домен человека), включая поликлональные и моноклональные антитела. В зависимости от типа константного домена в тяжелых цепях, полноразмерные антитела относят к одному из пяти основных классов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и антитела согласно настоящему изобретению могут относиться к любому из данных классов. Некоторые из них дополнительно подразделяют на подклассы или изотипы, такие как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и тому подобные. Константные домены тяжелой

цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называют α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Субъединичные структуры и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Как правило, когда в настоящем изобретении применяют полноразмерные антитела, а не их связывающие антиген участки, предпочтительны IgG (например, IgG₂) и/или IgM, так как они являются наиболее распространенными антителами в физиологических условиях и так как их легче всего получить в лабораторных условиях.

«Легкие цепи» антител млекопитающих относят к одному из двух явно различных типов: каппа (κ) и лямбда (λ), на основании последовательностей аминокислот их константных доменов и некоторых аминокислот в каркасных областях их переменных доменов. В некоторых вариантах реализации предпочтительны легкие цепи каппа (κ).

Специалисты в данной области поймут, что иммунологические связывающие реагенты, входящие в объем термина «антитело», включают или распространяются на все антитела и их связывающие антиген фрагменты, включая полноразмерные антитела, димерные, тримерные и мультимерные антитела; биспецифические антитела; химерные антитела; рекомбинантные и сконструированные антитела, и их фрагменты.

Термин «антитело», следовательно, применяют по отношению к любой подобной антителу молекуле, которая содержит область связывания антигена, и данный термин включает фрагменты антител, которые включают связывающий антиген домен, такой как Fab', Fab, F(ab')₂, однодоменные антитела (DAB), димер TandAbs, Fv, scFv (одноцепочечный Fv), dsFv, ds-scFv, Fd, линейные антитела, минитела, диатела, биспецифические фрагменты антител, битело, тритело (слитые scFv-Fab, биспецифические или триспецифические, соответственно); sc-диатело; каппа(лямбда)-тела (слитые scFv-CL); BiTE (биспецифические антитела, которые привлекают Т-клетки, тандемы scFv-scFv для привлечения Т-клеток); DVD-Ig (антитело с двойным переменным доменом, биспецифический формат); SIP (малый иммунобелок, разновидность минитела); SMIP («малые модульные иммунофармацевтические средства», димер scFv-Fc; DART (ds-стабилизированное диатело «перенацеливающее антитело двойной аффинности»); малые миметики антител, содержащие один или более CDR, и тому подобные молекулы.

Методики получения и применения различных конструкций на основе антител и их фрагментов хорошо известны в данной области. Диатела, в частности, дополнительно описаны в EP 404 097 и WO 93/11161; тогда как линейные антитела дополнительно описаны в данной области.

В предпочтительных вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению представляют собой антитела человека, более предпочтительно полностью человеческие антитела. В этом отношении, у антител человека, как правило, есть по меньшей мере два потенциальных преимущества для применения в терапии человека. Во-первых,

иммунная система человека не должна распознавать указанное антитело как чужеродное. Во-вторых, время полувыведения из кровотока человека будет сходно с таковым для встречающегося в природе антитела человека, что позволит вводить меньшие и менее частые дозы.

5 Тем не менее, хотя известно, что антитела человека, как правило, проявляют данные преимущества, также известно, что разработка антител человека, которые обладают достаточно высокими аффинностями и подходящими функциональными свойствами, которые сделали бы их кандидатами для успешной терапии человека, совсем не просто.

Термин «человек» в данной заявке, применительно к молекулам антител и связывающим белкам, прежде всего относится к антителам и связывающим белкам, содержащим вариabельные области (например, области V_H, V_L, CDR или FR) и необязательно константные области антитела, выделенные или полученные из репертуара человека или соответствующие последовательностям, обнаруженным у людей или в репертуаре человека, например, в зародышевых или соматических клетках человека, или полученные из них.

10 Антитела 273_C12_C05 (исходный клон) и 273_C01_A12 согласно настоящему изобретению представляют собой примеры таких молекул антител человека, в которых вариabельные области были выделены из репертуара человека.

Антитела и связывающие белки «человека» согласно настоящему изобретению дополнительно содержат аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человека, например, мутации, введенные с помощью случайного или сайт-направленного мутагенеза *in vitro*, например, мутации, введенные с помощью клонирования *in vitro* или ПЦР. Конкретные примеры таких мутаций представляют собой мутации, которые включают консервативные замены или другие мутации в небольшом количестве остатков антитела или связывающего белка, например, в до 5, 4, 3, 2 или 1 из остатков антитела или связывающего

20 белка, предпочтительно, например, в до 5, 4, 3, 2 или 1 из остатков, составляющих один или более из CDR антитела или связывающего белка. Некоторые примеры таких антител «человека» включают антитела и вариabельные области, которые подвергли стандартным методикам модификации, чтобы уменьшить количество потенциально иммуногенных сайтов.

Таким образом, антитела «человека» согласно настоящему изобретению включают последовательности, родственные последовательностям, обнаруженным у людей, и полученные из них, но которые могут не существовать в природе в зародышевом репертуаре антител человека *in vivo*. Кроме того, антитела человека и связывающие белки согласно настоящему изобретению включают белки, содержащие консенсусные последовательности человека, определенные по последовательностям человека, или последовательности, по

30 существо гомологичные последовательностям человека.

Кроме того, антитела и связывающие белки «человека» согласно настоящему изобретению не ограничены комбинациями областей V_H, V_L, CDR или FR, которые сами

находятся в комбинации в молекулах антител человека. Таким образом, антитела и связывающие белки «человека» согласно настоящему изобретению могут включать или соответствовать комбинациям таких областей, которые не обязательно существуют в природе у людей (например, представляют собой не встречающиеся в природе антитела).

5 В предпочтительных вариантах реализации антитела человека будут полностью человеческими антителами. «Полностью человеческие» антитела в данной заявке представляют собой антитела, содержащие «человеческие» домены и/или CDR
10 вариабельной области, описанные выше, без значительного количества не относящихся к человеку последовательностей антител или вообще без не относящихся к человеку последовательностей антител. Например, антитела, содержащие человеческие домены и/или CDR вариабельной области «без значительного количества не относящихся к человеку
15 последовательностей антител», представляют собой антитела, домены и/или CDR, в которых только до 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоты представляют собой аминокислоты, которые не кодируются последовательностями антител человека. Таким образом, «полностью
20 человеческие» антитела отличаются от «гуманизированных» антител, которые основаны на по существу не относящихся к человеку доменах вариабельной области, например, доменах вариабельной области мыши, в которых некоторые аминокислоты были заменены, чтобы
25 лучше соответствовали аминокислотам, обычно присутствующим в антителах человека.

«Полностью человеческие» антитела согласно настоящему изобретению могут
20 представлять собой человеческие домены и/или CDR вариабельной области без каких-либо других значительных последовательностей антител, например, представляют собой одноцепочечные антитела. В качестве альтернативы, «полностью человеческие» антитела согласно настоящему изобретению могут представлять собой человеческие домены и/или
25 CDR вариабельной области, которые являются единым целым или функционально присоединены к одной или более константным областям антитела человека. Некоторые предпочтительные полностью человеческие антитела представляют собой антитела IgG с полным комплектом константных областей IgG.

В других вариантах реализации антитела «человека» согласно настоящему изобретению будут представлять собой частично человеческие химерные антитела.
30 «Частично человеческие химерные» антитела в данной заявке представляют собой антитела, содержащие «человеческие» домены и/или CDR вариабельных областей, функционально присоединенные или привитые на константную область не относящихся к человеку видов, таких как крыса или мышь. Такие частично человеческие химерные антитела можно использовать, например, в доклинических испытаниях, в которых константная область
35 предпочтительно будет получена из того же вида животного, которого используют в доклиническом испытании. Данные частично человеческие химерные антитела также можно применять, например, в диагностике *ex vivo*, в которой константная область из не

относящегося к человеку вида может обеспечить дополнительные возможности для детектирования антитела.

В предпочтительных вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению представляют собой не относящиеся к мышинным антитела.

5 Термин «определяющая комплементарность область тяжелой цепи» («CDR тяжелой цепи») в данной заявке относится к участкам гипервариабельности внутри вариабельной области тяжелой цепи (домену V_H) молекулы антитела. Вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR, названные CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3 тяжелой цепи от аминоконца к карбоксильному концу. Вариабельная область тяжелой цепи также содержит
10 четыре каркасные области (FR1, FR2, FR3 и FR4 от аминоконца к карбоксильному концу). Данные каркасные области разделяют указанные CDR.

Термин «вариабельная область тяжелой цепи» (домен V_H) в данной заявке относится к вариабельной области тяжелой цепи молекулы антитела.

Термин «определяющая комплементарность область легкой цепи» («CDR легкой
15 цепи») в данной заявке относится к участкам гипервариабельности внутри вариабельной области легкой цепи (домену V_L) молекулы антитела. Вариабельные области легкой цепи содержат три CDR, названные CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи от аминоконца к карбоксильному концу. Вариабельная область легкой цепи также содержит четыре каркасные области (FR1, FR2, FR3 и FR4 от аминоконца к карбоксильному концу).
20 Данные каркасные области разделяют указанные CDR.

Термин «вариабельная область легкой цепи» (домен V_L) в данной заявке относится к вариабельной области легкой цепи молекулы антитела.

Антитела можно разделить на фрагменты, применяя обычные методики. Например, фрагменты $F(ab')_2$ можно получить путем обработки антитела пепсином. Полученный в
25 результате этого фрагмент $F(ab')_2$ можно обработать, чтобы восстановить дисульфидные мостики с получением фрагментов Fab'. Расщепление папаином может приводить к образованию фрагментов Fab, Fab', $F(ab')_2$, scFv, Fv, dsFv, Fd, dAbs, TandAbs, ds-scFv, димеры, миниантитела, диатела, биспецифические фрагменты антител и другие фрагменты также можно синтезировать с помощью рекомбинантных методик или можно синтезировать
30 химическим способом. Методики получения фрагментов антител хорошо известны и описаны в данной области.

В некоторых вариантах реализации антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению содержит полноразмерную или часть константной области тяжелой цепи, такой как константная область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, IgM или IgD.
35 Предпочтительно константная область тяжелой цепи представляет собой константную область тяжелой цепи IgG, например, константную область тяжелой цепи IgG2, или ее часть.

Более того, антитело или фрагмент антитела может содержать полноразмерную или часть константной области легкой цепи каппа или константной области легкой цепи лямбда, или ее часть. Полноразмерные или часть таких константных областей могут быть получены естественным путем или могут быть полностью или частично синтетическими. Подходящие последовательности таких константных областей хорошо известны и задокументированы в данной области. Если в состав антител согласно настоящему изобретению входит полный комплект константных областей из тяжелой и легкой цепей, такие антитела обычно называют в данной заявке «полноразмерными» антителами или «целыми» антителами. В некоторых вариантах реализации предпочтительны антитела IgG₂. Примеры антител согласно настоящему изобретению 273_C12_C05 (исходный клон), 273_C12_C05 (вариант 1), 273_C12_C05 (вариант 2) и 273_C01_A12 представляют собой антитела IgG₂.

Антитела или фрагменты антител могут быть получены естественным путем или могут быть получены полностью или частично синтетическим путем. Таким образом, антитело может быть получено из любого подходящего источника, например, из рекомбинантных источников, и/или получено в трансгенных животных или трансгенных растениях, или в яйцах, применяя методику IgY. Таким образом, молекулы антител можно получить *in vitro* или *in vivo*.

Предпочтительно антитело или фрагмент антитела содержит переменную область легкой цепи (V_L) антитела, которая содержит три домена CDR, и переменную область тяжелой цепи (V_H) антитела, которая содержит три домена CDR. Указанные V_L и V_H как правило образуют сайт связывания антигена.

Фрагмент «Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный сайт распознавания и связывания антигена. Данная область содержит димер одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи в плотной, нековалентной ассоциации. Она находится в такой конфигурации, что три гиперпеременные области (CDR) каждого переменного домена взаимодействуют, обозначая границы сайта связывания антигена на поверхности димера V_H-V_L. В совокупности, шесть гиперпеременных областей (CDR) придают антителу специфичность связывания антигена.

Тем не менее, в данной области хорошо известно, что присутствие трех CDR из переменного домена легкой цепи и трех CDR из переменного домена тяжелой цепи антитела не всегда необходимо для связывания антигена. Таким образом, известно, что эффективны конструкции, меньшие чем описанный выше классический фрагмент антитела.

Например, у верблюдовых антител широкий репертуар связывания антигенов, но отсутствуют легкие цепи. Также, результаты, полученные для однодоменных антител, содержащих домены V_H отдельно или домены V_L отдельно, показали, что данные домены могут связываться с антигеном с приемлемо высокими аффинностями. Таким образом, три CDR могут эффективно связывать антиген.

Таким образом, хотя предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению могут содержать шесть участков CDR (три из легкой цепи и три из тяжелой цепи), антитела с менее чем шестью участками CDR (например, с 3 участками CDR) входят в объем настоящего изобретения. Также предложены антитела с CDR только из тяжелой цепи или из легкой цепи.

Предпочтительные участки CDR легкой цепи для применения вместе с определенными участками CDR тяжелой цепи описаны в других местах в данной заявке. Тем не менее, также предполагается применение других переменных областей легкой цепи, которые содержат три CDR, вместе с переменными областями тяжелой цепи согласно настоящему изобретению. Подходящие переменные области легкой цепи, которые можно применять в комбинации с переменными областями тяжелой цепи согласно настоящему изобретению и которые позволяют получить антитело, которое связывает PD-1 в соответствии с настоящим изобретением, сможет легко определить специалист в данной области.

Например, переменную область тяжелой цепи согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с одной переменной областью легкой цепи или репертуаром переменных областей легкой цепи, и исследовать связывание с PD-1 полученных в результате этого антител.

При необходимости, аналогичные способы можно применять, чтобы определить альтернативные переменные области тяжелой цепи для применения в комбинации с предпочтительными переменными областями легкой цепи согласно настоящему изобретению.

В еще одном дополнительном аспекте настоящего изобретения предложено антитело, предпочтительно выделенное антитело, более предпочтительно антитело человека (или полностью человеческое), которое связывается или специфично распознает PD-1 и которое обладает способностью конкурировать (т.е. связываться с тем же или по существу тем же эпитопом) с 273_C12_C05 (исходным клоном), и/или 273_C12_C05 (вариантом 1), и/или 273_C12_C05 (вариантом 2), и/или 273_C01_A12 (т.е. с антителом, содержащим VL с последовательностью SEQ ID NO: 4 и VH с последовательностью SEQ ID NO: 3, или с антителом, содержащим VL с последовательностью SEQ ID NO: 22 и VH с последовательностью SEQ ID NO: 21, или с антителом, содержащим VL с последовательностью SEQ ID NO: 40 и VH с последовательностью SEQ ID NO: 39, или с антителом, содержащим VL с последовательностью SEQ ID NO: 58 и VH с последовательностью SEQ ID NO: 57, соответственно), описанными в данной заявке, или способностью конкурировать с антителом, содержащим такие же CDR, как и в 273_C12_C05 (исходном клоне), и/или 273_C12_C05 (варианте 1), и/или 273_C12_C05 (варианте 2), и/или 273_C01_A12 (т.е. антителе, содержащем последовательности CDR VL, представленные в SEQ ID NO: 8, 9 и 10, и последовательности CDR VH, представленные в SEQ ID NO: 5, 6 и 7,

или антителе, содержащем последовательности CDR VL, представленные в SEQ ID NO: 26, 9 и 10, и последовательности CDR VH, представленные в SEQ ID NO: 5, 6 и 7, или антителе, содержащем последовательности CDR VL, представленные в SEQ ID NO: 26, 9 и 10, и последовательности CDR VH, представленные в SEQ ID NO: 5, 6 и 7, или антителе, содержащем последовательности CDR VL, представленные в SEQ ID NO: 62, 63 и 64, и последовательности CDR VH, представленные в SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно), за связывание с PD-1. Другие особенности и свойства других аспектов настоящего изобретения распространяются, с необходимыми изменениями, на данный аспект настоящего изобретения.

Связывание с тем же эпитопом/антигеном можно легко проверить с помощью способов, хорошо известных и описанных в данной области, например, применяя анализы связывания, такие как анализ конкурентного ингибирования. Таким образом, для специалиста в данной области очевидно, что анализы связывания можно применять, чтобы идентифицировать другие антитела и фрагменты антител с такими же специфичностями связывания, как у антител и фрагментов антител согласно настоящему изобретению. Подходящие анализы связывания обсуждаются в других местах в данной заявке.

Предпочтительно описанные выше способности и свойства наблюдают на измеримом или значимом уровне и, более предпочтительно, на статистически значимом уровне по сравнению с подходящими контрольными уровнями. Подходящие уровни значимости обсуждаются в других местах в данной заявке. Более предпочтительно, одну или более из описанных выше способностей и свойств наблюдают на уровне, который измеримо лучше или, более предпочтительно, значимо лучше по сравнению со способностями, наблюдаемыми для антител из известного уровня техники.

В любом статистическом анализе, на который ссылаются в данной заявке, предпочтительно у статистически значимого отличия от соответствующего контроля или другой единицы сравнения или измерения значение вероятности $< 0,1$, предпочтительно $< 0,05$. Подходящие способы определения статистической значимости хорошо известны и задокументированы в данной области, и можно применять любой из них.

В других предпочтительных вариантах реализации предложены антитела второго поколения, обладающие улучшенными или превосходящими свойствами по сравнению с исходным антителом против PD-1 согласно настоящему изобретению, таким как 273_C12_C05 (исходный клон), 273_C12_C05 (вариант 1), 273_C12_C05 (вариант 2) или 273_C01_A12.

Легко осуществить сравнения для идентификации эффективных антител второго поколения и провести количественный анализ, например, применяя один или более из различных анализов, подробно описанных в данной заявке или в данной области. Антитела второго поколения, которые обладают биологическим свойством или активностью,

улучшенными по меньшей мере приблизительно в 2 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 20 раз и предпочтительно по меньшей мере приблизительно в 50 раз по сравнению с антителами против PD-1 согласно настоящему изобретению, примерами которых являются антитела 273_C12_C05 (исходный клон), 273_C12_C05 (вариант 1), 273_C12_C05 (вариант 2) или 273_C01_A12, входят в объем настоящего изобретения.

Антитело, связывающий белок и молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, как правило, представляют собой «выделенные» или «очищенные» молекулы в том смысле, что они отличаются от любых таких компонентов, которые могут присутствовать *in situ* в организме человека или животного или в образце ткани, полученном из организма человека или животного. Указанные последовательности, тем не менее, могут соответствовать или быть по существу гомологичными последовательностям, находящимся в организме человека или животного. Таким образом, термин «выделенный» или «очищенный» в данной заявке в отношении молекул или последовательностей нуклеиновых кислот и белков или полипептидов, например, антител, относится к таким молекулам, когда они выделены, очищены или по существу свободны от их природного окружения, например, выделены или очищены из организма человека или животного (если в действительности они встречаются в природе), или относится к таким молекулам, когда они получены с помощью технического процесса, т.е., включает молекулы, полученные рекомбинантным и синтетическим путем.

Таким образом, термин «выделенный» или «очищенный», когда его применяют по отношению к молекуле белка или полипептида, такой как CDR 1, 2 и 3 легкой цепи, CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи, вариабельные области легкой цепи, вариабельные области тяжелой цепи и связывающие белки или антитела согласно настоящему изобретению, включая полноразмерные антитела, обычно относится к белку, по существу свободному от клеточного материала или других белков из источника, из которого его получили. В некоторых вариантах реализации, особенно когда указанный белок предназначен для введения людям или животным, такие выделенные или очищенные белки по существу свободны от культуральной среды, когда они получены с помощью рекомбинантных методик, или от химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе.

Термин «последовательность нуклеиновой кислоты» или «молекула нуклеиновой кислоты» в данной заявке относится к последовательности мономеров нуклеозидов или нуклеотидов, состоящей из встречающихся в природе оснований, сахаров и связей между сахарами (каркаса). Данный термин также включает модифицированные или содержащие заместители последовательности, содержащие не встречающиеся в природе мономеры или их части. Последовательности нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению могут представлять собой последовательности дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) или последовательности рибонуклеиновых кислот (РНК) и могут содержать встречающиеся в

природе основания, включая аденин, гуанин, цитозин, тимидин и урацил. Указанные последовательности также могут включать модифицированные основания. Примеры таких модифицированных оснований включают аза- и деаза- аденин, гуанин, цитозин, тимидин и урацил; и ксантин и гипоксантин. Указанные молекулы нуклеиновых кислот могут быть
5 двухцепочечными или одноцепочечными. Указанные молекулы нуклеиновых кислот могут быть полностью или частично синтетическими или рекомбинантными.

Термин «фрагмент» в данной заявке относится к фрагментам биологического значения, например, к фрагментам, которые вносят вклад в связывание антигена, например, образуют часть сайта связывания антигена, и/или вносят вклад в функциональные свойства
10 антитела PD-1. Некоторые предпочтительные фрагменты включают переменную область тяжелой цепи (домен V_H) и/или переменную область легкой цепи (домен V_L) антител согласно настоящему изобретению.

Для специалиста в данной области очевидно, что белки и полипептиды согласно настоящему изобретению, такие как CDR легкой и тяжелой цепей, переменные области
15 легкой и тяжелой цепей, антитела, фрагменты антител и иммуноконъюгаты можно получить любым из нескольких способов, хорошо известных и описанных в данной области, но наиболее предпочтительно их получают, применяя рекомбинантные способы.

Фрагменты нуклеиновых кислот, кодирующие переменные области легкой и тяжелой цепей антител согласно настоящему изобретению, можно произвести или получить с
20 помощью любого подходящего способа, например, путем клонирования или синтеза.

После получения фрагментов нуклеиновых кислот, кодирующих переменные области легкой и тяжелой цепей антител согласно настоящему изобретению, данные фрагменты можно дополнительно обработать с помощью стандартных методик рекомбинантной ДНК, например, чтобы превратить фрагменты переменной области в
25 полноразмерные молекулы антител с подходящими доменами константной области, или в конкретные форматы фрагментов антител, обсуждаемые в других местах в данной заявке, например, фрагменты Fab, фрагменты scFv, и т.д. Обычно, или в рамках данной процедуры дополнительной обработки, фрагменты нуклеиновых кислот, кодирующие указанные молекулы антител согласно настоящему изобретению, как правило, включают в один или
30 более подходящих векторов экспрессии, чтобы способствовать получению антител согласно настоящему изобретению.

Возможные векторы экспрессии включают, но не ограничены перечисленными: космиды, плазмиды или модифицированные вирусы (например, лишенные способности реплицироваться ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), при условии,
35 что вектор совместим с используемой клеткой-хозяином. Векторы экспрессии «подходят для трансформации клетки-хозяина», что означает, что указанные векторы экспрессии содержат молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению и регуляторные

последовательности, выбранные на основании клеток-хозяев, которые будут применять для экспрессии, которые функционально связаны с молекулой нуклеиновой кислоты. Предполагается, что функционально связанный означает, что нуклеиновая кислота связана с регуляторными последовательностями таким образом, который позволяет экспрессию

5 указанной нуклеиновой кислоты.

Следовательно, в настоящем изобретении предложен рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, или ее фрагмент, и регуляторные последовательности, необходимые для транскрипции и трансляции белковой последовательности, кодируемой указанной молекулой нуклеиновой

10 кислоты согласно настоящему изобретению.

Подходящие регуляторные последовательности можно получить из различных источников, включая гены бактерий, грибов, вирусов, млекопитающих или насекомых, и они хорошо известны в данной области. Выбор подходящих регуляторных последовательностей зависит от клетки-хозяина, выбранной, как обсуждается ниже, и его может легко осуществить

15 средний специалист в данной области. Примеры таких регуляторных последовательностей включают: промотор и энхансер транскрипции или последовательность связывания с РНК-полимеразой, последовательность связывания с рибосомой, включая сигнал инициации трансляции. Кроме того, в зависимости от выбранной клетки-хозяина и используемого вектора, другие последовательности, такие как точка начала репликации, дополнительные

20 сайты рестрикции ДНК, энхансеры и последовательности, придающие способность вызывать транскрипцию, можно включить в состав указанного вектора экспрессии.

Рекомбинантные векторы экспрессии согласно настоящему изобретению также могут содержать ген селектируемого маркера, который способствует селекции клеток-хозяев, трансформированных или трансфицированных рекомбинантной молекулой согласно

25 настоящему изобретению.

Рекомбинантные векторы экспрессии также могут содержать гены, которые кодируют слитую молекулу, которая обеспечивает повышенную экспрессию рекомбинантного белка; повышенную растворимость рекомбинантного белка; и способствует очистке целевого рекомбинантного белка, действуя как лиганд при аффинной очистке (например, могут

30 присутствовать подходящие «метки», дающие возможность очистки и/или идентификации, например, метки His или метки тус).

Рекомбинантные векторы экспрессии можно внедрить в клетки-хозяева с получением трансформированной клетки-хозяина. Предполагается, что в объем терминов «трансформированные», «трансфицированные», «трансформация» и «трансфекция» входит

35 внедрение нуклеиновой кислоты (например, вектора) в клетку с помощью одной из множества возможных методик, известных в данной области. Подходящие способы трансформирования и трансфицирования клеток-хозяев можно найти в Sambrook и др., 1989 (Sambrook, Fritsch и

Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ое изд., Cold Spring Harbor Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк, 1989) и других лабораторных руководствах.

Подходящие клетки-хозяева включают большое разнообразие эукариотических клеток-хозяев и прокариотических клеток. Например, белки согласно настоящему изобретению можно экспрессировать в клетках дрожжей или клетках млекопитающих. Кроме того, белки согласно настоящему изобретению можно экспрессировать в прокариотических клетках, таких как *Escherichia coli*.

Учитывая идею, предложенную в данной заявке, промоторы, терминаторы и способы внедрения векторов экспрессии подходящего типа в клетки растений, птиц и насекомых также можно легко осуществить.

В качестве альтернативы, белки согласно настоящему изобретению также можно экспрессировать в не относящихся к человеку трансгенных животных, таких как крысы, кролики, овцы и свиньи.

Белки согласно настоящему изобретению также можно получить с помощью химического синтеза, применяя методики, хорошо известные в химии белков, такие как твердофазный синтез.

Слитые по N-концу или C-концу белки, включающие антитела и белки согласно настоящему изобретению, конъюгированные с другими молекулами, такими как белки, можно получить путем слияния с помощью рекомбинантных методик. Полученные слитые белки содержат антитело или белок согласно настоящему изобретению, слитый с селективируемым белком, или маркерным белком, или метящим белком, описанным в данной заявке. Антитела и белки согласно настоящему изобретению также можно конъюгировать с другими белками с помощью известных методик. Например, указанные белки можно соединить применяя гетеробифункциональные содержащие тиол линкеры, описанные в WO 90/10457: N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиопропионат) или N-сукцинимидил-5-тиоацетат.

В еще одном дополнительном аспекте предложена экспрессионная конструкция или вектор экспрессии, содержащий один или более фрагментов, или сегментов, или молекул нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Предпочтительно экспрессионные конструкции или векторы являются рекомбинантными. Предпочтительно указанные конструкции или векторы дополнительно содержат необходимые регуляторные последовательности для транскрипции и трансляции белковой последовательности, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

В еще одном дополнительном аспекте предложена клетка-хозяин или вирус, содержащие одну или более экспрессионных конструкций или векторов экспрессии согласно настоящему изобретению. Также предложены клетки-хозяева или вирусы, содержащие одну или более молекул нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Клетка-хозяин

(например, клетка-хозяин из млекопитающего) или вирус, экспрессирующий антитело согласно настоящему изобретению, представляют собой еще один дополнительный аспект.

В еще одном дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения (или производства) антитела согласно настоящему изобретению, включающий этап культивирования клеток-хозяев согласно настоящему изобретению. Предпочтительные способы включают следующие этапы: (i) культивирование клетки-хозяина, содержащей один или более рекомбинантных векторов экспрессии или одну или более последовательностей нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению при условиях, подходящих для экспрессии кодируемого антитела или белка; и необязательно (ii) выделение или получение антитела или белка из указанной клетки-хозяина или из ростовой среды/супернатанта. Такие способы получения (или производства) также могут включать этап очистки антитела или белкового продукта и/или включения антитела или продукта в состав композиции, содержащей по меньшей мере один дополнительный компонент, такой как фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

В вариантах реализации, в которых антитело или белок согласно настоящему изобретению состоит из более чем одной полипептидной цепи (например, некоторые фрагменты, такие как фрагменты Fab или полноразмерные антитела), предпочтительно, чтобы все полипептиды экспрессировались в указанной клетке-хозяине либо с одного и того же, либо с различных векторов экспрессии, так чтобы целые белки, например, белки антител согласно настоящему изобретению, могли соединиться в клетке-хозяине, и их можно было выделить или очистить из нее.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ связывания PD-1, включающий приведение в контакт композиции, содержащей PD-1, с антителом согласно настоящему изобретению или его иммуноконъюгатом.

В другом дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен способ детектирования PD-1, включающий приведение в контакт композиции, в которой подозревают присутствие PD-1, с антителом согласно настоящему изобретению или его иммуноконъюгатом при условиях, эффективных для обеспечения возможности образования комплексов PD-1/антитело и обнаружения комплексов, образованных таким образом.

Антитела согласно настоящему изобретению также можно применять для получения дополнительных антител, которые связываются с PD-1. Такие применения включают, например, добавление, делецию, замену или вставку одной или более аминокислот в последовательности аминокислот исходного антитела с получением нового антитела, при этом указанное исходное антитело представляет собой одно из антител согласно настоящему изобретению, описанных в других местах в данной заявке, и проверку полученного в результате этого нового антитела, чтобы идентифицировать антитела, которые связываются с PD-1, в соответствии с настоящим изобретением. Такие способы можно применять для

получения множества новых антител, у всех из которых можно проверить наличие способности связывать PD-1. Предпочтительно указанное добавление, делеция, замена или вставка одной или более аминокислот происходит в одном или более из доменов CDR.

5 Такую модификацию или мутацию исходного антитела можно осуществить любым подходящим способом, применяя методики, хорошо известные и задокументированные в данной области, например, путем осуществления способов случайного или направленного мутагенеза. Если нужно использовать направленный мутагенез, то в одной стратегии определения подходящих для мутагенеза остатков используют разрешение кристаллической структуры комплекса связывающий белок-антиген, например, комплекса АТ-АГ, чтобы
10 определить ключевые остатки, участвующие в связывании антигена. Сканирующий аланином мутагенез также представляет собой обычный способ, который можно применять, чтобы определить ключевые остатки, участвующие в связывании антигена. Затем такие остатки можно мутировать, чтобы усилить взаимодействие. В качестве альтернативы, один или более аминокислотных остатков можно просто подвергнуть направленному мутагенезу и оценить
15 влияние на связывание с PD-1.

Случайный мутагенез можно осуществить любым подходящим способом, например, с помощью допускающей ошибки ПЦР, перетасовки цепей или штаммов-мутаторов *E. coli*.

Таким образом, один или более доменов V_H согласно настоящему изобретению можно комбинировать с одним доменом V_L или репертуаром доменов V_L из любого подходящего
20 источника, и исследовать полученные в результате этого новые антитела, чтобы определить антитела, которые связываются с PD-1. И наоборот, один или более доменов V_L согласно настоящему изобретению можно комбинировать с одним доменом V_H или репертуаром доменов V_H из любого подходящего источника, и исследовать полученные в результате этого новые антитела, чтобы определить антитела, которые связываются с PD-1.

25 Аналогично, один или более, или предпочтительно все три CDR из доменов V_H и/или V_L согласно настоящему изобретению можно привить на один домен V_H и/или V_L или на репертуар доменов V_H и/или V_L, соответственно, и исследовать полученные в результате этого новые антитела, чтобы определить антитела, которые связываются с PD-1.

Способы проведения описанной выше манипуляции над аминокислотами и доменами
30 белков хорошо известны специалисту в данной области. Например, указанные манипуляции можно удобно осуществить с помощью генной инженерии на уровне нуклеиновых кислот, при этом молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие подходящие связывающие белки и их домены, модифицируют таким образом, что последовательность аминокислот полученного в результате этого экспрессированного белка, в свою очередь, модифицирована подходящим
35 образом.

Новые антитела, полученные с помощью данных способов, предпочтительно будут обладать улучшенными функциональными свойствами, например, более высокой или

усиленной аффинностью (или по меньшей мере эквивалентной аффинностью) к PD-1 по сравнению с исходными антителами, и их можно будет обрабатывать и применять таким же образом, как и антитела согласно настоящему изобретению, описанные в других местах в данной заявке (например, для терапии, диагностики, в композициях и т.д.). В качестве альтернативы или дополнения, новые антитела будут обладать одним или более другими улучшенными функциональными свойствами, описанными в других местах в данной заявке.

Новые антитела, произведенные, полученные или которые можно получить с помощью данных способов, представляют собой еще один дополнительный аспект настоящего изобретения.

Проверку способности одного или более антител связываться с PD-1 можно осуществить с помощью любого подходящего способа, который хорошо известен и описан в данной области. Подходящие способы также описаны в разделе Пример.

Согласно настоящему изобретению также предложен диапазон конъюгированных антител и их фрагментов, в котором антитело против PD-1 функционально присоединено к по меньшей мере одному другому терапевтическому или диагностическому агенту. Термин «иммуноконъюгат» применяют в широком смысле для описания функциональной ассоциации антитела с другим действующим агентом (например, терапевтическим агентом) и не подразумевают, что он относится только к какому-либо типу функциональной ассоциации и, в частности, не ограничен химическим «конъюгированием». В частности, предложены рекомбинантные слитые белки. При условии, что доставляющий или нацеливающий агент способен связываться с мишенью и терапевтический или диагностический агент достаточно функционален после доставки, способ присоединения будет подходящим. В одном варианте реализации интерлейкины можно связать (конъюгировать) или другим образом соединить с соответствующими антителами.

В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению применяют (например, применяют терапевтически) в «голой» неконъюгированной форме.

Композиции, содержащие по меньшей мере первое антитело согласно настоящему изобретению или его иммуноконъюгат, представляют собой дополнительный аспект настоящего изобретения. Составы (композиции), содержащие одно или более антител согласно настоящему изобретению в смеси с подходящим разбавителем, носителем или вспомогательным веществом представляют собой предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения. Такие составы могут быть предназначены для применения в фармацевтике, и, следовательно, композиции согласно настоящему изобретению предпочтительно являются фармацевтически приемлемыми. Подходящие разбавители, вспомогательные вещества и носители известны специалисту.

Композиции согласно настоящему изобретению могут присутствовать, например, в форме, подходящей для перорального, назального, парентерального, внутривенного, топического или ректального введения. В предпочтительном варианте реализации композиции согласно настоящему изобретению присутствуют в форме, подходящей для
5 внутривенного введения. В некоторых вариантах реализации композиции согласно настоящему изобретению присутствуют в форме, подходящей для интраперитонеального (и/п) введения. В некоторых вариантах реализации композиции согласно настоящему изобретению присутствуют в форме, подходящей для инъекции в вену или в опухоль.

Активные соединения, описанные в данной заявке, могут присутствовать в обычных
10 фармакологических формах для введения, таких как таблетки, таблетки в оболочке, назальные спреи, растворы, эмульсии, липосомы, порошки, капсулы или формы с замедленным высвобождением. Для получения данных форм можно применять обычные фармацевтические вспомогательные вещества, а также обычные способы производства.

Растворы для инъекций, например, можно получить обычным способом, например,
15 путем добавления консервирующих агентов, таких как пара-гидроксibenзоаты, или стабилизаторов, таких как ЭДТА. Полученными растворами затем можно наполнить флаконы или ампулы для инъекций.

Назальные спреи можно составить сходным образом в водном растворе и поместить в контейнер для распыления, либо с аэрозольным пропеллентом, либо с предоставленными
20 средствами для ручной компрессии.

Фармацевтические композиции (составы) согласно настоящему изобретению предпочтительно вводят парентерально. Внутривенное введение является предпочтительным. В некоторых вариантах реализации введение представляет собой интраперитонеальное (и/п) введение. В некоторых вариантах реализации введение
25 осуществляют путем инъекции в опухоль. Парентеральное введение можно осуществить с помощью подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекции посредством шприца. В качестве альтернативы, парентеральное введение можно осуществить посредством инфузионной помпы. Дополнительный вариант представляет собой композицию, которая может представлять собой порошок или жидкость для введения антитела в форме назального
30 или легочного спрея. В качестве еще одного дополнительного варианта, антитела согласно настоящему изобретению также можно вводить трансдермально, например, из пластыря, необязательно из ионофоретического пластыря, или трансмукозально, например, буккально.

Подходящие единицы дозирования может определить специалист в данной области.

Указанные фармацевтические композиции могут дополнительно содержать
35 дополнительные активные ингредиенты (например, описанные в других местах в данной заявке) в контексте схем совместного введения или схем комбинированного введения.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложены антитела против PD-1, описанные в данной заявке, для применения в терапии, в частности, для применения для лечения рака или для лечения расстройства иммунной системы. Лечение рака является предпочтительным.

5 В другом аспекте настоящего изобретения предложены иммуноконъюгаты согласно настоящему изобретению для применения в терапии, в частности, для применения для лечения рака или для лечения расстройства иммунной системы. Лечение рака является предпочтительным.

10 В соответствии с настоящим изобретением, антитела могут быть нацелены на PD-1-положительные Т-клетки и/или PD-1-положительные про-В-клетки.

В одном варианте реализации лечат солидные опухоли.

В некоторых вариантах реализации лечат опухоль или рак (например, солидную опухоль), которая отличается экспрессией PD-L1 (например, на ее поверхности).

15 В некоторых вариантах реализации заболевание (например, рак или расстройство иммунной системы) отличается (или связано с) передачей сигналов PD-1/PD-L1 (например, aberrантной, или нефизиологической, или нежелательной передачей сигналов PD-1/PD-L1, например, повышенной передачей сигналов PD-1/PD-L1).

Предпочтительные раки, которые необходимо лечить в соответствии с настоящим изобретением, включают немелкоклеточный рак легких (НМРЛ, например, плоскоклеточный
20 НМРЛ), мелкоклеточный рак легких (например, запущенную стадию заболевания мелкоклеточным раком легких), меланому (например, метастатическую меланому, такую как BRAF-отрицательная метастатическая меланома или множественная меланома), лимфому (например, острую Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому или хроническую лимфоцитарную лимфому), лейкоз (например, острый миелоидный лейкоз,
25 острый лимфобластный лейкоз или миелодиспластический синдром), почечно-клеточный рак (ПКР, например, светлоклеточный рак почки), колоректальный рак, уротелиальный рак мочевого пузыря, рак уретры, рак головы и шеи (например, рецидивирующий или метастатический плоскоклеточный рак головы и шеи), рак молочной железы (например, метастатический HER-2-отрицательный рак молочной железы), распространенный рак
30 печени, рак головного мозга (например, глиобластома или астроцитому), рак желудка, рак пищевода, карциному поджелудочной железы, аденокарциномы, мезотелиому, перитонеальный рак, рак фаллопиевых труб, рак шейки матки, рак яичников, метастатическую саркому, гематологические новообразования. В некоторых вариантах реализации рак, который необходимо лечить, является метастатическим.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации рак, который необходимо лечить в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой колоректальный рак. В некоторых предпочтительных вариантах реализации рак, который необходимо лечить в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой карциному толстого
5 кишечника.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации рак, который необходимо лечить в соответствии с настоящим изобретением, выбран из группы, состоящей из рака легких (например, немелкоклеточного рака легких), почечноклеточной карциномы, карциномы печени, метастатической меланомы и рецидивирующей лимфомы Ходжкина.

10 Без привязки к какой-либо теории полагают, что антитела согласно настоящему изобретению могут превосходить антитела ниволумаб и/или пембролизумаб в отношении терапевтической эффективности (например, при терапии рака, такого как колоректальный рак, например, что оценивают в модели колоректального рака у мышей), и/или в отношении токсичности, и/или в отношении биодоступности, и/или в отношении времени полувыведения
15 (или других фармакокинетических параметров).

Как описано в других местах в данной заявке, предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению обладают преимуществами над антителом ниволумаб, например, некоторыми преимуществами в отношении кинетики связывания. Предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению также могут обладать преимуществами
20 (например, аналогичными преимуществами) в отношении кинетики связывания над антителом пембролизумаб.

Способы *in vivo* и применения, описанные в данной заявке, как правило осуществляют у млекопитающего. Можно лечить любого млекопитающего, например, людей и любое сельскохозяйственное, домашнее или лабораторное животное. Конкретные примеры
25 включают мышей, крыс, свиней, кошек, собак, овец, кроликов, коров и обезьян. Предпочтительно, тем не менее, млекопитающее представляет собой человека.

Таким образом, термин «животное» или «пациент» в данной заявке включает любое млекопитающее, например, людей и любое сельскохозяйственное, домашнее или лабораторное животное. Конкретные примеры включают мышей, крыс, свиней, кошек, собак,
30 овец, кроликов, коров и обезьян. Предпочтительно, тем не менее, животное или пациент представляет собой человека. Таким образом, субъекты или пациенты, которых лечат в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно будут представлять собой людей.

С альтернативной точки зрения, согласно настоящему изобретению предложен способ лечения рака или расстройства иммунной системы, указанный способ включает введение
35 нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению, описанного в данной заявке. Лечение рака является предпочтительным. Варианты реализации терапевтических применений согласно

настоящему изобретению, описанных в данной заявке, распространяются, с необходимыми изменениями, на данный аспект настоящего изобретения.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения заболевания, которое отличается передачей сигналов PD-1/PD-L1, указанный способ включает введение
5 нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению, описанного в данной заявке. Варианты реализации терапевтических применений согласно настоящему изобретению, описанных в данной заявке, распространяются, с необходимыми изменениями, на данный аспект настоящего изобретения.

10 Терапевтически эффективное количество будут определять на основании клинической оценки, и его можно легко контролировать. Предпочтительные методы лечения рака описаны в других местах в данной заявке.

С другой дополнительной точки зрения, согласно настоящему изобретению предложено применение антитела согласно настоящему изобретению, описанного в данной
15 заявке, в производстве лекарственного средства для применения в терапии. Предпочтительная терапия представляет собой терапию рака, описанную в других местах в данной заявке (например, терапию солидных опухолей). Терапия также может представлять собой терапию расстройства иммунной системы. Варианты реализации терапевтических применений согласно настоящему изобретению, описанных в данной заявке,
20 распространяются, с необходимыми изменениями, на данный аспект настоящего изобретения.

С другой дополнительной точки зрения, согласно настоящему изобретению предложено применение антитела согласно настоящему изобретению, описанного в данной заявке, для лечения заболевания, которое отличается передачей сигналов PD-1/PD-L1.
25 Предпочтительное применение представляет собой применение для лечения рака (описанное в других местах в данной заявке). Варианты реализации терапевтических применений согласно настоящему изобретению, описанных в данной заявке, распространяются, с необходимыми изменениями, на данный аспект настоящего изобретения.

30 Антитела, и композиции, и способы, и применения согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с другими терапевтическими и диагностическими средствами. В отношении биологических агентов, предпочтительно диагностических или терапевтических агентов, для применения «в комбинации» с антителом против PD-1 в соответствии с настоящим изобретением термин «в комбинации» используют для краткости, чтобы охватить
35 диапазон вариантов реализации. Формулировка «в комбинации», если конкретно не указано или не ясно из научной терминологии иное, таким образом, распространяется на различные

форматы комбинированных композиций, фармацевтические средства, коктейли, наборы, способы и первичные и вторичные медицинские применения.

«Комбинированные» варианты реализации настоящего изобретения, следовательно, включают, например, варианты реализации, в которых антитело против PD-1 согласно настоящему изобретению представляет собой голое антитело, и его применяют в комбинации с агентом или терапевтическим агентом (например, химиотерапевтическим агентом), который функционально не присоединен к нему. В других «комбинированных» вариантах реализации настоящего изобретения антитело против PD-1 согласно настоящему изобретению представляет собой иммуноконъюгат, в котором антитело само функционально связано или объединено с агентом или терапевтическим агентом. Функциональное присоединение включает все формы непосредственного и опосредованного присоединения, описанные в данной заявке и известные в данной области.

«Комбинированные» применения, особенно в отношении антитела против PD-1 согласно настоящему изобретению в комбинации с терапевтическими агентами, также включают комбинированные композиции, фармацевтические средства, коктейли, наборы, способы и первичные и вторичные медицинские применения, в которых указанный терапевтический агент находится в виде пролекарства. В таких вариантах реализации активирующий компонент, способный превратить пролекарство в функциональную форму лекарственного средства, также может быть функционально связан с антителами против PD-1 согласно настоящему изобретению.

В некоторых вариантах реализации терапевтические композиции, комбинации, фармацевтические средства, коктейли, наборы, способы и первичные и вторичные медицинские применения будут представлять собой «комбинации пролекарств». Средние специалисты в данной области поймут, что термин «комбинация пролекарств», если не указано иное, означает, что антитело согласно настоящему изобретению функционально присоединено к компоненту, способному превратить пролекарство в активное лекарственное средство, а не то, что антитело присоединено к самому пролекарству. Тем не менее, не требуется, чтобы пролекарства в вариантах реализации настоящего изобретения обязательно применялись в виде комбинаций пролекарств. Соответственно, пролекарства можно применять любым способом, которым их применяют в данной области, включая форму адепт (ADEPT) и другие формы.

Таким образом, когда описаны комбинированные композиции, фармацевтические средства, коктейли, наборы, способы и первичные и вторичные медицинские применения, предпочтительно в отношении диагностических агентов и, более предпочтительно, терапевтических агентов, указанные комбинации включают антитела против PD-1, которые представляют собой голые антитела и иммуноконъюгаты, и при этом осуществление

вариантов реализации настоящего изобретения *in vivo* включает предварительное, одновременное или последовательное введение указанных голых антител или иммуноконъюгата и биологического, диагностического или терапевтического агента; при условии, что, в некоторой конъюгированной или неконъюгированной форме, добиваются всеобъемлющего предоставления некоторой формы антитела и некоторой формы биологического, диагностического или терапевтического агента.

Предшествующие и другие объяснения влияния настоящего изобретения на опухоли приведены, чтобы просто объяснить комбинированный принцип действия, тип присоединенного агента(-ов) и тому подобное. Данный описательный подход не следует истолковывать как либо занижение, либо излишнее упрощение полезных свойств антител против PD-1 согласно настоящему изобретению. Следовательно, будет понятно, что такие антитела сами обладают направленными против PD-1 свойствами и что иммуноконъюгаты таких антител будут сохранять данные свойства и комбинировать их со свойствами присоединенного агента; и более того, что комбинированное действие антитела и любого присоединенного агента, как правило, будет усилено и/или увеличено.

Следовательно, в настоящем изобретении предложены композиции, фармацевтические композиции, терапевтические наборы и медицинские коктейли, содержащие, необязательно по меньшей мере в первой композиции или контейнере, биологически эффективное количество по меньшей мере первого антитела против PD-1 согласно настоящему изобретению, или антигенсвязывающего фрагмента или иммуноконъюгата такого антитела против PD-1; и биологически эффективное количество по меньшей мере второго биологического агента, компонента или системы.

Указанный «по меньшей мере второй биологический агент, компонент или система» часто будет представлять собой терапевтический или диагностический агент, компонент или систему, но не обязательно. Например, по меньшей мере второй биологический агент, компонент или система может включать компоненты для модификации антитела и/или для прикрепления других агентов к антителу. Некоторые предпочтительные вторые биологические агенты, компоненты или системы представляют собой пролекарства или компоненты для получения и применения пролекарств, включая компоненты для получения самого пролекарства и компоненты для приспособления антител согласно настоящему изобретению для функционирования в таких вариантах реализации, включающих пролекарство или адепт.

Когда терапевтические или диагностические агенты включены как по меньшей мере второй биологический агент, компонент или система, такие терапевтические и/или диагностические средства, как правило, будут предназначены для применения, связанного с лечением или диагностикой одного или более расстройств, описанных выше.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации «по меньшей мере второй терапевтический агент» будет входить в состав терапевтического набора или коктейля. Данный термин выбран с учетом того, что антитело против PD-1 согласно настоящему изобретению представляет собой первый терапевтический агент.

5 В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанный второй терапевтический агент может представлять собой радиотерапевтический агент, химиотерапевтический агент, антиангиогенный агент, вызывающий апоптоз агент, антитубулиновое лекарственное средство, противоклеточный или цитотоксический агент, стероид, антагонист цитокина, ингибитор экспрессии цитокина, антагонист хемокина, ингибитор
10 экспрессии хемокина, ингибитор АТФазы, противовоспалительный агент, ингибитор сигнального пути, другой ингибитор контрольных точек, противораковый агент, другие антитела или коагулянты.

В отношении композиций, наборов и/или лекарственных средств согласно настоящему изобретению, объединенные эффективные количества терапевтических агентов могут
15 содержаться в одном контейнере или контейнерных устройствах или могут содержаться в различных контейнерах или контейнерных устройствах. Коктейли, как правило, будут смешивать для комбинированного применения. Агенты, составленные для внутривенного введения, часто будут предпочтительны. Также можно включить компоненты для визуализации. Наборы также могут содержать инструкции по применению по меньшей мере
20 первого антитела и одного или более других включенных биологических агентов.

Вообще говоря, по меньшей мере второй терапевтический агент можно вводить животному или пациенту по существу одновременно с антителом против PD-1 согласно настоящему изобретению; например, в виде одной фармацевтической композиции или в виде
двух фармацевтических композиций, которые вводят близко друг к другу.

25 В качестве альтернативы, по меньшей мере второй терапевтический агент можно вводить животному или пациенту в момент времени после введения антитела против PD-1 согласно настоящему изобретению. «В момент времени после» в данной заявке означает «с перерывами», так что по меньшей мере второй терапевтический агент вводят животному или пациенту в момент времени, отличный от момента введения антитела против PD-1 согласно
30 настоящему изобретению. Как правило, два указанных агента вводят в моменты времени, эффективно разнесенные друг от друга, чтобы позволить двум указанным агентам оказать свои соответствующие терапевтические действия, т.е., их вводят с «биологически эффективными интервалами времени». По меньшей мере второй терапевтический агент можно вводить животному или пациенту в биологически эффективный момент до введения
35 антитела против PD-1 согласно настоящему изобретению или в биологически эффективный момент после указанного терапевтического средства.

В еще дополнительных аспектах предложены способы диагностики или визуализации субъекта, включающие введение подходящего количества антитела или другого белка согласно настоящему изобретению, описанного в данной заявке, субъекту и детектирование присутствия, и/или количества, и/или локализации антитела или другого белка согласно настоящему изобретению у субъекта.

Подходящие заболевания, которые можно визуализировать или диагностировать в соответствии с настоящим изобретением, описаны в других местах в данной заявке, относящихся к лечению заболеваний.

В одном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ диагностирования рака или расстройства иммунной системы (предпочтительно диагностирования рака) у млекопитающего, включающий этап:

- (a) приведения в контакт тестируемого образца, полученного из указанного млекопитающего, с одним или более антителами согласно настоящему изобретению.

В дополнительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ диагностирования рака или расстройства иммунной системы (предпочтительно диагностирования рака) у млекопитающего, включающий следующие этапы:

- (a) приведение в контакт тестируемого образца, полученного из указанного млекопитающего, с одним или более антителами согласно настоящему изобретению;
- (b) измерение присутствия, и/или количества, и/или локализации комплекса антитело-антиген в тестируемом образце; и необязательно
- (c) сравнение присутствия и/или количества комплекса антитело-антиген в тестируемом образце с контролем.

В описанных выше способах указанный этап приведения в контакт проводят при условиях, которые позволяют образование комплекса антитело-антиген. Подходящие условия может легко определить специалист в данной области.

В описанных выше способах можно применять любой подходящий тестируемый образец, например, биоптат клеток, тканей или органов, которые предположительно поражены заболеванием, или гистологические срезы.

В некоторых из описанных выше способов, присутствие любого количества комплекса антитело-антиген в тестируемом образце будет указывать на наличие заболевания. Предпочтительно для постановки положительного диагноза количество комплекса антитело-антиген в тестируемом образце больше, предпочтительно значительно больше, чем количество, обнаруженное в подходящем контрольном образце. Более предпочтительно,

значительно большие уровни статистически значимо больше, предпочтительно со значением вероятности $<0,05$. Подходящие способы определения статистической значимости хорошо известны и задокументированы в данной области, и можно применять любой из них.

Подходящие контрольные образцы может легко выбрать специалист в данной области, например, в случае диагностики конкретного заболевания, подходящий контроль будет представлять собой образец из субъекта, у которого нет указанного заболевания. Подходящие контрольные «значения» также можно легко определить без запуска контрольного «образца» в каждом анализе, например, опираясь на диапазон значений для нормальных субъектов, известный в данной области.

Для применения для диагностики или визуализации, антитела согласно настоящему изобретению можно пометить детектируемым маркером, таким как рентгеноконтрастное вещество или радиоактивный изотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I ; радиоактивный излучатель (например, α , β или γ излучатели); флуоресцентное (флуорофор) или хемилюминисцентное (хромофор) соединение, такое как флуоресцеинизотиоцианат, родамин или люциферин; фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или пероксидаза хрена; визуализирующий агент; или ион металла; или химическая молекула, такая как биотин, который можно обнаружить по связыванию со специфической распознаваемой детектируемой молекулой, например, меченым авидином/стрептавидином. Способы присоединения метки к связывающему белку, такому как антитело или фрагмент антитела, известны в данной области. Такие детектируемые маркеры позволяют определить присутствие, количество или локализацию комплексов связывающий белок-антиген в тестируемом образце, который необходимо исследовать.

Предпочтительные детектируемые маркеры для применения *in vivo* включают детектируемое рентгенологически соединение, такое как висмут (III), золото (III), лантан (III) или свинец (II); радиоактивный йон, такой как медь⁶⁷, галлий⁶⁷, галлий⁶⁸, индий¹¹¹, индий¹¹³, йод¹²³, йод¹²⁵, йод¹³¹, ртуть¹⁹⁷, ртуть²⁰³, рений¹⁸⁶, рений¹⁸⁸, рубидий⁹⁷, рубидий¹⁰³, технеций^{99m} или иттрий⁹⁰; изотоп ядерного магнитного спинового резонанса, такой как кобальт (II), медь (II), хром (III), диспрозий (III), эрбий (III), гадолиний (III), гольмий (III), железо (II), железо (III), марганец (II), неодим (III), никель (II), самарий (III), тербий (III), ванадий (II) или иттербий (III); или родамин или флуоресцеин.

Настоящее изобретение также включает диагностические или визуализирующие агенты, включающие антитела согласно настоящему изобретению, присоединенные к метке, которая продуцирует детектируемый сигнал, непосредственно или опосредованно. Подходящие метки описаны в других местах в данной заявке.

В одном варианте реализации способ диагностирования рака или расстройства иммунной системы представляет собой способ *in vitro*.

В одном варианте реализации способ диагностирования рака или расстройства иммунной системы представляет собой способ *in vivo*.

Предпочтительные заболевания (например, раки), которые нужно диагностировать, описаны в данной заявке (например, в контексте методов лечения рака).

5 С альтернативной точки зрения, согласно настоящему изобретению предложен способ скрининга наличия рака или расстройства иммунной системы у субъекта.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ анализа (или прогнозирования) того, будет или нет вероятная (предположительная) польза для субъекта, страдающего раком (у которого известно наличие рака), от лечения, направленного против PD-1 (например, от терапии антителом против PD-1 согласно настоящему изобретению).
10 Такой способ может включать один или более из этапов, описанных выше в контексте способа диагностирования. В таком способе присутствие, и/или количество, и/или локализация комплекса антитело/антиген в тестируемом образце может указывать (прогнозировать) на то, будет или нет вероятная (предположительная) польза для субъекта, страдающего раком (у которого известно наличие рака), от лечения, направленного против PD-1 (например, от
15 терапии антителом против PD-1 согласно настоящему изобретению). Например, если PD-1 присутствует (например, выше конкретного уровня или количества, например, по сравнению с контрольным уровнем или количеством, и/или в конкретной локализации), то указанному субъекту может принести пользу (предположительно принесет пользу) лечение, направленное против PD-1. Серийное (периодическое) измерение присутствия, и/или количества, и/или локализации PD-1 также можно осуществить, например, с целью обнаружить либо повышения, либо снижения количества/уровней с течением времени.

С альтернативной точки зрения, согласно настоящему изобретению предложен способ прогнозирования ответа субъекта на направленную против PD-1 терапию рака (например, терапию антителом против PD-1 согласно настоящему изобретению). С другой точки зрения, согласно настоящему изобретению предложен способ определения (или контролирования) эффективности схемы лечения, которую применяют для лечения рака (например, схемы
25 лечения антителом против PD-1), другими словами, отслеживания ответа на лечение.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ контролирования прогрессирования рака у субъекта. Таким образом, способы (или антитела) согласно настоящему изобретению можно также применять для контролирования прогрессирования заболевания. Такое контролирование может происходить до, во время или после (предпочтительно во время) лечения рака (например, с помощью направленной против PD-1 терапии). Такой способ может включать один или более из этапов, описанных выше в
30 контексте способа диагностирования. В таком способе, если количество PD-1, обнаруженное во время (или после) терапии, уменьшается (например, с течением времени), то это может свидетельствовать о том, что рак регрессирует (улучшился/улучшается прогноз). В таком

способе, если количество PD-1, обнаруженное во время (или после) терапии, возрастает (например, с течением времени), то это может свидетельствовать о том, что рак усугубился (ухудшился/ухудшается прогноз).

В некоторых вариантах реализации серийное (периодическое) измерение PD-1 (присутствия, и/или количества, и/или локализации) в соответствии с настоящим изобретением также можно использовать для прогностических целей, с целью обнаружить либо повышение, либо снижение количеств (или уровней) с течением времени. В некоторых вариантах реализации повышенный уровень PD-1 с течением времени (например, по сравнению с контрольным уровнем) может свидетельствовать об ухудшении прогноза. В некоторых вариантах реализации пониженный уровень PD-1 с течением времени (например, по сравнению с контрольным уровнем) может свидетельствовать об улучшении прогноза.

В некоторых вариантах реализации особенности способов анализа (или прогнозирования) того, будет или нет вероятная (предположительная) польза для субъекта, страдающего раком (у которого известно наличие рака), от лечения, направленного против PD-1, способов прогнозирования ответа субъекта на направленную против PD-1 терапию рака, способов определения (или контролирования) эффективности схемы лечения, которую применяют для лечения рака, и способов контролирования прогрессирования рака у субъекта также можно использовать, с необходимыми изменениями, в отношении расстройств иммунной системы.

В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению можно применять в качестве сопутствующих диагностических средств.

В одном варианте реализации (например, способов диагностирования, или прогнозирования, или контролирования согласно настоящему изобретению) субъект (например, человек) представляет собой субъекта с повышенным риском развития рака (или расстройства иммунной системы) или с повышенным риском возникновения рака (или расстройства иммунной системы), например, здорового субъекта или субъекта, не проявляющего какие-либо симптомы рака (или расстройства иммунной системы) или любого другого подходящего субъекта "с повышенным риском". В другом варианте реализации субъект представляет собой субъекта, страдающего, или предположительно страдающего раком (или у которого предположительно развился рак), или потенциально страдающего раком (или у которого потенциально развился рак) (или расстройство иммунной системы). Например, субъект (или образец, например, биоптат ткани из субъекта) может быть положительным по одному или более маркерам рака (например, биомаркерам рака, отличным от PD-1) и/или может быть известно (диагностировано) наличие у него аномального типа ткани или аномального роста ткани (например, что оценивают с помощью биопсии ткани).

В некоторых аспектах способ согласно настоящему изобретению может дополнительно включать исходный этап выбора субъекта (например, человека) с повышенным риском развития рака (или расстройства иммунной системы) или с повышенным риском возникновения рака (или расстройства иммунной системы), или у которого есть или
5 подозревают наличие (или развитие) рака (или расстройства иммунной системы), или у которого потенциально есть (или развивается) рак (или расстройство иммунной системы). Субъектов можно выбрать на основании того, что, например, указанный субъект (или образец, например, биоптат ткани из субъекта) положителен по одному или более маркерам рака (например, биомаркерам рака, отличным от PD-1), и/или у которого известно наличие (у
10 которого диагностирован) аномального типа ткани или аномального роста ткани (например, что оценили с помощью биопсии ткани). Последующие этапы способа можно осуществить на образце из такого выбранного субъекта.

В некоторых аспектах предложены способы согласно настоящему изобретению, которые дополнительно включают этап лечения рака (или расстройства иммунной системы)
15 с помощью терапии (например, фармацевтической терапии) или хирургического вмешательства. Например, если результат способа согласно настоящему изобретению указывает на наличие рака (или расстройства иммунной системы) у субъекта (например, поставлен положительный диагноз рака или расстройства иммунной системы), то можно осуществить дополнительный этап лечения рака (или расстройства иммунной системы) с
20 помощью терапии или хирургического вмешательства. В некоторых вариантах реализации диагностических/предсказательных/отслеживающих/прогностических способов согласно настоящему изобретению можно осуществить дополнительный этап лечения рака (или расстройства иммунной системы) с помощью терапии или хирургического вмешательства (например, если присутствует плохой прогноз). Способы лечения рака (или расстройства
25 иммунной системы) с помощью терапии или хирургического вмешательства известны в данной области.

В настоящем изобретении дополнительно предложены наборы, содержащие одно или более из антител, иммуноконъюгатов или композиций согласно настоящему изобретению, или одну или более из молекул нуклеиновых кислот, кодирующих антитела согласно
30 настоящему изобретению, или один или более рекомбинантных векторов экспрессии, содержащих последовательности нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, или одну или более клеток-хозяев или вирусов, содержащих рекомбинантные векторы экспрессии или последовательности нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Предпочтительно указанные наборы предназначены для применения в способах и
35 применениях, описанных в данной заявке, например, в способах терапии, диагностики или визуализации, описанных в данной заявке, или для применения в анализах или способах *in vitro*, описанных в данной заявке. Антитело в таких наборах может представлять собой

конъюгат антитела, описанный в других местах в данной заявке, например, антитело может быть конъюгировано с детектируемой молекулой или может представлять собой иммуноконъюгат. Предпочтительно указанные наборы содержат инструкции по применению компонентов набора. Предпочтительно указанные наборы предназначены для

5 диагностирования или лечения заболеваний, описанных в других местах в данной заявке, и необязательно содержат инструкции по применению компонентов набора для диагностирования или лечения таких заболеваний.

Антитела согласно настоящему изобретению, описанные в данной заявке, также можно применять в качестве молекулярных инструментов для применений и анализов *in vitro*

10 или *in vivo*. Так как антитела содержат сайт связывания антигена, они могут функционировать как представители специфически связывающихся пар, и данные молекулы можно применять в любом анализе, в котором требуется конкретный представитель связывающейся пары.

Следовательно, в еще дополнительных аспектах настоящего изобретения предложен реагент, который содержит антитело согласно настоящему изобретению, описанное в данной

15 заявке, и применение таких антител в качестве молекулярных инструментов, например, в анализах *in vitro* или *in vivo*.

ТАБЛИЦЫ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ НУКЛЕОТИДОВ И АМИНОКИСЛОТ, ОПИСАННЫХ В ДАННОЙ ЗАЯВКЕ, И ИХ ИДЕНТИФИКАТОРЫ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ (SEQ ID NO)

20 Все последовательности нуклеотидов представлены в данной заявке от 5' к 3' в соответствии с правилом, принятым в данной области техники.

Таблица А		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
273_C12_C05 (исходный клон)		
1	Домен VH (нт)	GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGA AGAAACCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAA GGCCTCCGGCTACACCTTCACCAGCTACTATGTGC ATTGGGTCCGACAGGCCCCAGGCCAGGGCCTGGA ATGGATGGGCGGCATCATCCCCATCTTCGGCACC GCCAACTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGA CCATCACCGCCGACGAGTCCACCTCCACCGCCTA CATGGAACGTGTCCTCCCTGCGGAGCGAGGACACC GCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCTGCACGGCT ACTCCTACGGCTACCCCGGCTATTGGGGCCAGGG CACCTGGTCACCGTGTCTCT
2	Домен VL (нт)	GACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCCTGC CCGTGACCTGGGCCAGCCTGCCTCCATCTCCTG CCGGTCTCCAGTCCCTGGTGTACCACGACGGC AACACCTACCTGAACTGGTTCCAGCAGCGGCCAG

Таблица А		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		GCCAGTCCCCTCGGCGGCTGATCTACGAGGTGTC CAACCGGGACTCTGGCGTGCCCGACAGATTCTCC GGCTCCGGCAGCGACACCGACTTCACCCTGAAGA TCAGCCGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGT ACTACTGCATGCAGGGCGCCTACCGGCCCTGAC CTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
3	Домен VH (ак)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYVH WVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTIT ADESTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCARDLHGYSYGY PGYWGQGTЛTVSS
4	Домен VL (ак)	DIVMTQSPLSLPVTЛGQPASISCRSSQSLVYHDGNTY LNWFQQRPGQSPRRLIYEVSNRDSGVPDRFSGSGS DTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGAYRPLTFGQGTK VEIK
5	CDR1 тяжелой цепи	SYVH
6	CDR2 тяжелой цепи	GIIPFGTANYAQKFQG
7	CDR3 тяжелой цепи	DLHGYSYGYPGY
8	CDR1 легкой цепи	RSSQSLVYHDGNTYLN
9	CDR2 легкой цепи	EVSNRDS
10	CDR3 легкой цепи	MQGAYRPLT
11	FR1 тяжелой цепи	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT
12	FR2 тяжелой цепи	WVRQAPGQGLEWMG
13	FR3 тяжелой цепи	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR
14	FR4 тяжелой цепи	WGQGTЛTVSS

Таблица А		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
15	FR1 легкой цепи	DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISC
16	FR2 легкой цепи	WFQQRPGQSPRRLIY
17	FR3 легкой цепи	GVPDRFSGSGSDTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
18	FR4 легкой цепи	FGQGTKVEIK
85	Тяжелая цепь (ак)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYVH WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTIT ADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDLHGYSYGY PGYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKV DKTVERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
86	Легкая цепь (ак)	DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYHDGNTY LNWFQQRPGQSPRRLIYEVSNRDSGVPDRFSGSGS DFTDLTKISRVEAEDVGVYYCMQGAYRPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYF REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
87	Тяжелая цепь (нт)	GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGA AGAAACCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAA GGCCTCCGGCTACACCTTCACCAGCTACTATGTGC ATTGGGTCCGACAGGCCCCAGGCCAGGGCCTGGA ATGGATGGGCGGCATCATCCCCATCTTCGGCACC GCCAACTACGCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGA CCATCACCGCCGACGAGTCCACCTCCACCGCCTA CATGGAAGTGTCTCCTGCGGAGCGAGGACACC GCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCTGCACGGCT

Таблица А		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		АСТССТАСГГСТАССССТГТТГГГГССАГГГ САССТГГТАСССТГТСТСТГСТССТАССААГ ГГССССТАССТГТТССССТГГССССТГСАГСА ГААГСАССАГСАГАГСАССГССГСССТГГГСТ ГССТГГТГААГГАСТТАТТССССТГАГССССТГАС СГТГАГСТГГАААГСАГСАГСССТГАСАГСАГ СГТГСАСАСТТСССТГСССТГСТГСАГАГСАГ ГГССТГТАСАГСТГАГСАГСТГГТГАССТГТ ССАГСАГСАСТТССГСАСССАГСАСТТАСАСТГ СААСТГГАСССАААГСССАГСАААССААГСТГ ГАААГАССТГГААААААГТГСТГСТГГАГТ ГСССТСССТГССССТГССССТГТГГСТГГССС САГСТГТТСТГТТСССТССААГСССААГГАА СССТГАТГАТСАГСААССССТГАГСТГАССТГ СГТГГТСТГТГАССТГАГССАГСАГССССТГА ГГТГСАГТТААСТГГТАСТГГАСГСАГСТГГАГ ГТГСАААГССААААААААГСССАГАГАГГАГ АГТТАААГСАСАСТТСАГАГТГГТГАССТГТ ГАССТГГТГАСААГГАСТГГСТГАААГССААГ ГАГТАААГТГААГСТГАГСААААГГСССТГ ССГССССТАТГАААААААААААААААААА ГГГССАГСССААААААААААААААААААА ССССТАГСААААААААААААААААААААА ТГАААААААААААААААААААААААААА САГСАААААААААААААААААААААААА ССАААААААААААААААААААААААААА АТГСТГАААААААААААААААААААААА ГСАААААААААААААААААААААААААА ГГГСАААААААААААААААААААААААА ГСССТГСААААААААААААААААААААА ГССТГААААААААААААААААААААААА
88	Легкая цепь (нт)	ГААТСТГАТГАААААААААААААААААА СССТГАААААААААААААААААААААА ССГТСТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТ ААААААААААААААААААААААААААА ГССТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТ САААААААААААААААААААААААААА ГГСТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТ ТСААААААААААААААААААААААААА ААААААААААААААААААААААААААА СТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТ ААААААААААААААААААААААААААА ААААААААААААААААААААААААААА САААААААААААААААААААААААААА СГТГГТГТГСТГТГАААААААААААААА ААААААААААААААААААААААААААА ГСААААААААААААААААААААААААА ГСААААААААААААААААААААААААА ААААААААААААААААААААААААААА ААААААААААААААААААААААААААА

Таблица А		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		AGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGAGGCGAGTGC

Таблица В		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
273_C12_C05 (вариант 1)		
19	Домен VH (нт)	GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGA AGAAACCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAA GGCCTCCGGCTACACCTTCACCAGCTACTATGTGC ATTGGGTCCGACAGGCCCCAGGCCAGGGCCTGGA ATGGATGGGCGGCATCATCCCCATCTTCGGCACC GCCAACTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGA CCATCACCGCCGACGAGTCCACCGACACCGCCTA CATGGAAGTGTCTCCTCCCTGCGGAGCGAGGACACC GCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCTGCACGGCT ACTCCTACGGCTACCCCGGCTATTGGGGCCAGGG CACCTGGTCACCGTGTCTCT
20	Домен VL (нт)	GACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCCTGC CCGTGACCCTGGGCCAGCCTGCCTCCATCTCCTG CCGGTCCCTCCAGTCCCTGGTGTACCACGACGCC AACACCTACCTGAACTGGTTCAGCAGCGGCCAG GCCAGTCCCCTCGGCGGCTGATCTACGAGGTGTC CAACCGGGACTCTGGCGTGCCCGACAGATTCTCC GGCTCCGGCAGCGACACCGACTTCACCCTGAAGA TCAGCCGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGT ACTACTGCATGCAGGGCGCCTACCGGCCCTGAC CTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAG
21	Домен VH (ак)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYVH WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTIT ADESTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDLHGYSYGY PGYWGQGLTVTVSS
22	Домен VL (ак)	DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYHDANTY LNWFQQRPGQSPRLIYEVSNRDSGVPDRFSGSGS DTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGAYRPLTFGQGTK VEIK
23 или 5	CDR1 тяжелой цепи	SYVH
24 или 6	CDR2 тяжелой цепи	GIPIFGTANYAQKFQG
25 или 7	CDR3 тяжелой цепи	DLHGYSYGYPGY
26	CDR1 легкой цепи	RSSQSLVYHDANTYLN

Таблица В		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
27 или 9	CDR2 легкой цепи	EVSNRDS
28 или 10	CDR3 легкой цепи	MQGAYRPLT
29	FR1 тяжелой цепи	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT
30	FR2 тяжелой цепи	WVRQAPGQGLEWMG
31	FR3 тяжелой цепи	RVTITADESTDTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR
32	FR4 тяжелой цепи	WGQGTЛVTVSS
33	FR1 легкой цепи	DIVMTQSPLSLPVTЛGQPASISC
34	FR2 легкой цепи	WFQQRPGQSPRRLIY
35	FR3 легкой цепи	GVPDRFSGSGSDTDFTЛKISRVEAEDVGВYYC
36	FR4 легкой цепи	FGQGTKVEIK
89	Тяжелая цепь (ак)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYVH WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTIT ADESTDTAYMELSSLRSEDТАVYYCARDLHGYSYG PGYWGQGTЛVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSNFGTQTуTCNVDHKPSNTKV DKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTFRVSVЛTVVHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PMLDSDGSFFLYSKЛTVDKSRWQQGNVFSCSVMHЕ ALHNHYTQKSLSLSPGK
90	Легкая цепь (ак)	DIVMTQSPLSLPVTЛGQPASISCRSSQSLVYHDANTY LNWFQQRPGQSPRRLIYEVSNRDSGVDPDRFSGSGS DTDFTЛKISRVEAEDVGВYYCMQGAYRPLTFGQGTK

Таблица В		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
91	Тяжелая цепь (нт)	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGA AGAAACCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAA GGCCTCCGGCTACACCTTTACCAGCTACTACGTGC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAGGGCCTGG AATGGATGGGCGGCATCATCCCCATCTTCGGCAC CGCCAACTACGCCAGAAATTCAGGGCAGAGTG ACCATCACCGCCGACGAGTCTACCGACACCGCCT ACATGGAAGTGTCTCCCTGCGGAGCGAGGACAC CGCCGTGTACTATTGCGCCAGAGATCTGCACGGC TACTCCTACGGCTACCCCGGCTATTGGGGACAGG GCACCCTCGTGACAGTGTCTCCGCTTCTACCAAG GGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCCCCCTTGCTCCA GATCCACCTCCGAGTCTACAGCCGCCCTGGGCTG CCTCGTGAAGGACTACTTTCCTGAGCCCGTGACC GTGTCTTGGAAGTCTGGCGCTCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCTCCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTCGTGACTGTGCCC TCCTCCAAGTTTGGCACCCAGACCTACACCTGTAA CGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAAGTGGAC AAGACCGTGGAACGGAAGTGTGCGTGGAATGCC CCCCTTGTCTGCCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTTC CGTGTTCTGTTCCTCCCCCAAGCCCAAGGACACC CTGATGATCAGCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCG TGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGACCCCGAGGT GCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTG CACAATGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGT TCAACAGCACCTTCCGGGTGGTGTCCGTGCTGAC CGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAG TACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTG CCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGA CAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCC CTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTC CCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCTTCCG ATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCC CGAGAACAATAACAAGACCACCCCCCATGCTG GACTCCGATGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCT GACTGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAAC GTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGC ACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGC CCCGGCAAA
92	Легкая цепь (нт)	GACATCGTGATGACCCAGTCCCCCCTGTCTCTGCC TGTGACCCTGGGACAGCCTGCCTCCATCTCCTGC AGATCCTCCAGTCCCTGGTGTACCACGACGCCA ACACCTACCTGAAGTGGTTCAGCAGCGGCCTGG CCAGTCTCCAGACGGCTGATCTACGAGGTGTCC AACCGGGACTCCGGCGTGCCCGATAGATTCTCCG GCTCTGGCTCCGACACCGACTTCACCCTGAAGATC

Таблица В		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		TCCCGGGTGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGACT ACTGTATGCAGGGCGCCTACCGGCCCTGACCTT TGGCCAGGGAACAAAGGTGGAAATCAAGCGGACC GTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCACCTTC CGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTTCTGTC GTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCCCGCGAGG CCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCA GTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAG GACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCAC CCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC AAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCC TGTCTAGCCCCGTGACCAAGTCTTCAACCGGGG CGAGTGC

SEQ ID NO: 23 идентична SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO: 24 идентична SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 25 идентична SEQ ID NO: 7.

5 SEQ ID NO: 27 идентична SEQ ID NO: 9.

SEQ ID NO: 28 идентична SEQ ID NO: 10.

Таблица С		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
273_C12_C05 (вариант 2)		
37	Домен VH (нт)	GAGGTGCAGCTCGTGCACTCTGGCGCCGAAGTGA AGAAACCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAA GGCCTCCGGCTACACCTTCACCAGCTACTATGTGC ATTGGGTCCGACAGGCCCCAGGCCAGGGCCTGGA ATGGATGGGCGGCATCATCCCCATCTTCGGCACC GCCAACTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGA CCATCACCGCCGACGAGTCCATCTCCACCGCCTA CATGGAAGTGTCTCCTCCCTGCGGAGCGAGGACACC GCCGTGTAATACTGCGCCAGGGACCTGCACGGCT ACTCCTACGGCTACCCCGGCTATTGGGGCCAGGG CACCCTGGTCACCGTGTCTCT
38	Домен VL (нт)	GACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCCTGC CCGTGACCCTGGGCCAGCCTGCCTCCATCTCCTG CCGGTCTCCAGTCCCTGGTGTACCACGACGCC AACACCTACCTGAACTGGTTCCAGCAGCGGCCAG GCCAGTCCCCTCGGCGGCTGATCTACGAGGTGTC CAACCGGGACTCTGGCGTGCCCGACAGATTCTCC

Таблица С		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		GGCTCCGGCAGCGACACCGACTTCACCCTGAAGA TCAGCCGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGT ACTACTGCATGCAGGGCGCCTACCGGCCCCTGAC CTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAG
39	Домен VH (ак)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYVH WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTIT ADESISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDLHGYSYGY PGYWGQGTLVTVSS
40	Домен VL (ак)	DIVMTQSPLSLPVTLGQPAISCRSSQSLVYHDANTY LNWFQQRPGQSPRRLIYEVSNRDSGVPDRFSGSGS DTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGAYRPLTFGQGTK VEIK
41, или 5, или 23	CDR1 тяжелой цепи	SYVH
42, или 6, или 24	CDR2 тяжелой цепи	GIPIFGTANYAQKFQG
43, или 7, или 25	CDR3 тяжелой цепи	DLHGYSYGYPGY
44 или 26	CDR1 легкой цепи	RSSQSLVYHDANTYLN
45, или 9, или 27	CDR2 легкой цепи	EVSNRDS
46, или 10, или 28	CDR3 легкой цепи	MQGAYRPLT
47	FR1 тяжелой цепи	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT
48	FR2 тяжелой	WVRQAPGQGLEWMG

Таблица С		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
	цепи	
49	FR3 тяжелой цепи	RVTITADESISTAYMELSSLRSED TAVYYCAR
50	FR4 тяжелой цепи	WGQGT LVT VSS
51	FR1 легкой цепи	DIVMTQSPLSLPVT LGQPASISC
52	FR2 легкой цепи	WFQQRPGQSPRR LIY
53	FR3 легкой цепи	GVPDRFSGSGSDT DFTLKISRVEAEDVGVYYC
54	FR4 легкой цепи	FGQG TKVEIK
93	Тяжелая цепь (ак)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTSYVH WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTIT ADESISTAYMELSSLRSED TAVYYCARDLHGYSYGY PGYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTV PSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKV DKTVERKCCVECP PCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTP PMLDSDGSFFLYSKLTV DKSRLWQQGNV FSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
94	Легкая цепь (ак)	DIVMTQSPLSLPVT LGQPASISCRSSQSLVYHDANTY LNWFQQRPGQSPRR LIYEVSNRDSGVPDRFSGSGS D DFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGAYRPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFY P REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC

Таблица С

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
95	Тяжелая цепь (нт)	GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGA AGAAACCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCTGCAA GGCCTCCGGCTACACCTTCACCAGCTACTATGTGC ATTGGGTCCGACAGGCCCCAGGCCAGGGCCTGGA ATGGATGGGCGGCATCATCCCCATCTTCGGCACC GCCAACTACGCCCAGAAATTCAGGGCAGAGTGA CCATCACCGCCGACGAGTCCATCTCCACCGCCTA CATGGAAGTGTCTCCTCCCTGCGGAGCGAGGACACC GCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCTGCACGGCT ACTCCTACGGCTACCCCGGCTATTGGGGCCAGGG CACCTGGTCACCGTGTCTCTGCCTCCACCAAG GGCCCCAGCGTGTTCCTCCCTGGCCCCCTGCAGCA GAAGCACCAGCGAGAGCACCGCCGCCCTGGGCT GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCCGTGAC CGTGAGCTGGAACAGCGGCGCCCTGACCAGCGG CGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGC GGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCAGCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTG CAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGACCGTGGAGAGAAAGTGCTGCGTGGAGT GCCCTCCCTGCCCGCTCCCCCTGTGGCTGGCCC CAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCCAAGCCCAAGGACA CCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTG CGTGGTTCGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGA GGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGC AGTTCAACAGCACCTTCAGAGTGGTGAGCGTGCT GACCGTGGTGCAACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGGCCTGC CCGCCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGACCAA GGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTG CCCCCTAGCAGAGAGGAGATGACCAAGAACCAGG TGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG CCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACACCCCCC ATGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACA GCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCA GGGCAACGTGTTGAGCTGCAGCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGA GCCTGAGCCCCGGCAAG
96	Легкая цепь (нт)	GACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCCTGC CCGTGACCCTGGGCCAGCCTGCCTCCATCTCCTG CCGGTCTCCAGTCCCTGGTGTACCACGACGCT AACACCTACCTGAACTGGTTCCAGCAGCGGCCAG GCCAGTCCCCTCGGCGGCTGATCTACGAGGTGTC CAACCGGGACTCTGGCGTGCCCGACAGATTCTCC GGCTCCGGCAGCGACACCGACTTCACCCTGAAGA TCAGCCGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGT ACTACTGCATGCAGGGCGCCTACCGGCCCTGAC CTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGA ACCGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCTCC CAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAG CGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCAGAG AGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCT GCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGA

Таблица С		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGC AGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGA AGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGAGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 41 идентична SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO: 42 идентична SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 43 идентична SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 7.

5 SEQ ID NO: 44 идентична SEQ ID NO: 26.

SEQ ID NO: 45 идентична SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 9.

SEQ ID NO: 46 идентична SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 10.

Таблица D		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
273_C01_A12		
55	Домен VH (нт)	GAGGTGCAGCTCGTGCACTCTGGCGCCGAAGTGA AGAAACCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAA GGCCTCCGGCTACACCTTCACCAGCTACTATGTGC ATTGGGTCCGACAGGCCCCAGGCCAGGGCCTGGA ATGGATGGGCGGCATCATCCCCATCTTCGGCACC GCCAACTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGA CCATCACCGCCGACGAGTCCATCTCCACCGCCTA CATGGAAGTGTCTCCTCCGTGCGGAGCGAGGACACC GCCGTGTAATACTGCGCCAGGGACCTGCACGGCT ACTCCTACGGCTACCCCGGCTATTGGGGCCAGGG CACCTGGTCACCGTGTCTCT
56	Домен VL (нт)	GACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCCTGC CCGTGACCCTGGGCCAGCCTGCCTCCATCTCCTG CCGGTCCCTCCAGTCCCTGGTGTACTCCGACGCC AACACCTACCTGAAGTGGTTCCAGCAGCGGCCTG GCCAGTCCCCTCGGCGGCTGATCTACGAGGTGTC CAACCGCGAGTCTGGCGTGCCCGACAGATTCTCC GGCTCCGGCTCTGCCACCGACTTCACCCTGAAGA TCAGCCGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGT ACTACTGCATGCAGGGCACCCAGCTGCCCTGAC CTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAG

Таблица D		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
57	Домен VH (ак)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYVH WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTIT ADESISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDLHGYSYGY PGYWGQGTLVTVSS
58	Домен VL (ак)	DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDANTY LNWFQQRPGQSPRRLIYEVSNRESGVPDRFSGSGS ATDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTQLPLTFGGGTK VEIK
59, или 5, или 23, или 41	CDR1 тяжелой цепи	SYVH
60, или 6, или 24, или 42	CDR2 тяжелой цепи	GIPIFGTANYAQKFQG
61, или 7, или 25, или 43	CDR3 тяжелой цепи	DLHGYSYGYPGY
62	CDR1 легкой цепи	RSSQSLVYSDANTYLN
63	CDR2 легкой цепи	EVSNRES
64	CDR3 легкой цепи	MQGTQLPLT
65	FR1 тяжелой цепи	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT
66	FR2 тяжелой цепи	WVRQAPGQGLEWMG

Таблица D		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
67	FR3 тяжелой цепи	RVTITADESISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR
68	FR4 тяжелой цепи	WGQGTLVTVSS
69	FR1 легкой цепи	DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISC
70	FR2 легкой цепи	WFQQRPGQSPRRLIY
71	FR3 легкой цепи	GVPDRFSGSGSATDFTLKISRVEAEDVGVYYC
72	FR4 легкой цепи	FGGGTKVEIK
97	Тяжелая цепь (ак)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYVH WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTIT ADESISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDLHGYSYGY PGYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKV DKTVERKCCVECPGPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
98	Легкая цепь (ак)	DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVSDANTY LNWFQQRPGQSPRRLIYEVSNRESGVPDRFSGSGS ATDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTQLPLTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
99	Тяжелая цепь (нт)	GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGA AGAAACCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCTGCAA

Таблица D

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		GGCCTCCGGCTACACCTTCACCAGCTACTATGTGC ATTGGGTCCGACAGGCCCCAGGCCAGGGCCTGGA ATGGATGGGCGGCATCATCCCCATCTTCGGCACC GCCAACTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGA CCATCACCGCCGACGAGTCCATCTCCACCGCCTA CATGGAAGTGTCTCCCTGCGGAGCGAGGACACC GCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCTGCACGGCT ACTCCTACGGCTACCCCGGCTATTGGGGCCAGGG CACCTGGTCACCGTGTCTCTGCCTCCACCAAG GGCCCCAGCGTGTTCCTCCCTGGCCCCCTGCAGCA GAAGCACCAGCGAGAGCACCGCCGCCCTGGGCT GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGAC CGTGAGCTGGAACAGCGGCGCCCTGACCAGCGG CGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGC GGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCAGCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTG CAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGACCGTGGAGAGAAAGTGCTGCGTGGAGT GCCCTCCCTGCCCGCTCCCCCTGTGGCTGGCCC CAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCCAAGCCCAAGGACA CCCTGATGATCAGCAGAACCCCGAGGTGACCTG CGTGGTCGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGA GGTGACGTTCACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGC AGTTCAACAGCACCTTCAGAGTGGTGAGCGTGCT GACCGTGGTGACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGGCCTGC CCGCCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGACCAA GGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTG CCCCCTAGCAGAGAGGAGATGACCAAGAACCAGG TGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG CCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACACCCCCC ATGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACA GCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCA GGGCAACGTGTTTACGCTGCAGCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGA GCCTGAGCCCCGGCAAG
100	Легкая цепь (нт)	GACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCCTGC CCGTGACCCCTGGGCCAGCCTGCCTCCATCTCCTG CCGGTCCCTCCAGTCCCTGGTGTACTCCGACGCC AACACCTACCTGAACTGGTTCAGCAGCGGCCTG GCCAGTCCCCTCGGCGGCTGATCTACGAGGTGTC CAACCGCGAGTCTGGCGTGCCCGACAGATTCTCC GGCTCCGGCTCTGCCACCGACTTCACCCTGAAGA TCAGCCGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGT ACTACTGCATGCAGGGCACCCAGCTGCCCTGAC CTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGA ACCGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTATCTTCCCTCC CAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAG CGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCAGAG AGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCT GCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGA GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGC AGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGA

Таблица D		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		AGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGAGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 59 идентична SEQ ID NO: 41, и SEQ ID NO: 23, и SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO: 60 идентична SEQ ID NO: 42, и SEQ ID NO: 24, и SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 61 идентична SEQ ID NO: 43, и SEQ ID NO: 25, и SEQ ID NO: 7.

5

Таблица E. Консенсусные последовательности.

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
73	CDR1 легкой цепи	R S S Q S L V Y X ₉ D X ₁₁ N T Y L N
74	CDR1 легкой цепи	R S S Q S L V Y H/S D G/A N T Y L N
75	CDR2 легкой цепи	E V S N R X ₆ S
76	CDR2 легкой цепи	E V S N R D/E S
77	CDR3 легкой цепи	M Q G X ₄ X ₅ X ₆ P L T
78	CDR3 легкой цепи	M Q G A/T Y/Q R/L P L T
79	FR3 тяжелой цепи	R V T I T A D E S X ₁₀ X ₁₁ T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R
80	FR3 тяжелой цепи	R V T I T A D E S T/I S/D T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R

Таблица F. Последовательности антитела ниволумаб, применяемого в экспериментах в данной заявке.

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
81	Домен VH (ак)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVR QAPGKGLEWVAVIWDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKN TLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGT LVTVSS
82	Домен VL (ак)	ASEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLE PEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRT
83	Тяжелая цепь (ак)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVR QAPGKGLEWVAVIWDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKN TLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGT LVTVSSAST KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNF GTQTYTC NVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKC AVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPM LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
84	Легкая цепь (ак)	ASEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLE PEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTAAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC

Настоящее изобретение далее будет дополнительно описано в следующем
5 неограничивающем примере с ссылкой на следующие фигуры.

Фигура 1. Данные сенсограммы BIAcore, показывающие связывание PD-1-rCd4 человека и яванского макака с иммобилизованными 273_C12_C05 (A), 273_C01_A12 (B) и ниволумабом (C). Протокол для определения аффинностей был таким же, как описанный в инструкции к набору “Human Antibody Capture Kit” (GE Healthcare, BR-1008-39). 2000 RU
10 антитела против Ig (Fc) человека иммобилизовали на проточных кюветах 1 и 2 сенсорного чипа CM5. Было захвачено 2 нМ антитела против PD-1 (IgG2) (время контакта 60 с), что

выразилось в 20 RU. На кривых показаны экспериментальные результаты для связывания и диссоциации PD-1-rCD4 человека и обезьяны (*Cynomolgus*). Впрыскивали двукратные разведения из 50 нМ PD-1 при скорости потока 30 мкл/мин. Ассоциацию измеряли в течение 2 минут, диссоциацию - в течение 10 минут. Все измерения проводили при 25 °C в ФБР, pH 7,4, 0,05 % Tween 20. На кривых показаны данные за вычетом данных для эталонной проточной кюветы. Аппроксимированные черные линии получали с помощью программного обеспечения BIAcore T100 Evaluation с допущением взаимодействия 1:1.

Фигура 2. Антитела против PD-1 273_C12 и 273_C01 (IgG₂) связывают PD-1 человека в анализе ELISA. Культуральные супернатанты, содержащие IgG2 против PD-1 (273_C12 и 273_C01), инкубировали в планшетах ELISA, покрытых антителами против Fc. После инкубации и промывки детектировали связывание антигена биотинилированным PD-1-rCD4 человека, применяя меченый европием стрептавидин.

Фигура 3. Антитела против PD-1 273_C12_C05, 273_C01_A12 и ниволумаб (IgG₂) связываются с клетками, экспрессирующими эндогенный PD-1, что обнаружили с помощью проточной цитометрии. Продемонстрировали экспрессию PD-1 на стабильно экспрессирующей PD-1 линии клеток Jurkat, но не на клетках Jurkat дикого типа (ДТ), путем окрашивания клеток антителом против PD-1, конъюгированным с PE (A). Связывания антител против PD-1 273_C12_C05, 273_C01_A12, ниволумаба и антитела против лизоцима D1.3 (10 нМ) с PD-1 не наблюдали на клетках Jurkat ДТ (B), так как на их поверхности не экспрессируется PD-1. Наблюдали связывание антител против PD-1 273_C12_C05, 273_C01_A12 и ниволумаба с экспрессирующими PD-1 клетками Jurkat, тогда как не наблюдали связывания неспецифического антитела против лизоцима D1.3 (C). На образцах клеток, смешанных с антителом ниволумаб, но без антитела против Fc-PE, продемонстрировали, что связывание антитела можно было обнаружить только после окрашивания антителом против Fc-PE (B, C). Для контроля с окрашиванием только антителом против Fc-PE получили профиль, сходный с таковым для неокрашенных образцов (B, C). Клетки промывали, инкубировали с 10 нМ антитела, снова промывали, а затем окрашивали антителом против Fc-PE (Biolegend, HP6017). Все жизнеспособные клетки использовали для анализа.

Фигура 4. Антитела против PD-1 273_C12_C05, 273_C01_A12 и ниволумаб (IgG₂) проявляют блокирование в биохимическом анализе связывания лиганда PD-1/PD-L1. (A) Формат ELISA. (B) Сигнал ELISA на log оси y, (C) % блокирования взаимодействия PD-L1/PD-1. 100% взаимодействие определяли как присутствие взаимодействующих партнеров PD-L1-rCD4, PD-1-Fc в отсутствие какого-либо блокирующего антитела; 100 % блокирование определяли как отсутствие PD-1-Fc.

Фигура 5. Антитела против PD-1 273_C12_C05 (A) и 273_C01_A12 (B) (IgG₂) ингибируют опосредованную PD-1/PD-L1 репрессию ответа Т-клеток в стабильно экспрессирующей

GloResponse NFAT-luc/PD-1 линии клеток Jurkat/основанном на клеточной системе репортерном анализе PD-L1 HEK293 (Promega). Подробности эксперимента приведены в разделе Пример. Результаты нанесены на график в виде среднего значения по трем повторным измерениям.

5

Пример.

Антитела против PD-1 273_C12_C05, 273_C01_A12 и ниволумаб, применяемые в экспериментах в данном примере, представляют собой антитела IgG₂. У всех данных антител одинаковая константная область IgG₂.

10 **Аффинность**

Материалы и методы

Эксперименты с использованием поверхностного плазмонного резонанса (ППР) проводили, применяя устройство BIAcore T100 и следуя протоколу из набора Human Antibody Capture Kit (GE, BR-1008-39). 2000 единиц ответа (RU) антитела к Fc IgG человека (GE, BR-1008-39) иммобилизовали на проточных кюветах (ПК) 1 и 2 сенсорного чипа CM5 Series 5 на основе декстрана (GE, BR-1005-30), применяя химию образования поперечных связей EDC/NHS, следуя протоколу из набора для связывания аминов (GE, BR-1000-50). Очищенное IgG2 против PD-1 (273_C12_C05 (исходный клон), 273_C01_A12 или ниволумаб) разбавляли до концентрации 2 нМ в ФБР, pH 7,4, 0,05% Tween-20 и впрыскивали в ПК2 при скорости потока 10 мкл/мин, время контакта 60 с. Обычно это приводило к захвату в среднем 20 RU антитела. Впрыскивали двукратные разведения из 50 нМ PD-1 при скорости потока 30 мкл/мин. Ассоциацию измеряли в течение 2 минут, диссоциацию - в течение 10 минут. Все измерения проводили при 25 °C в ФБР, pH 7,4, 0,05 % Tween 20. Кинетические параметры определяли путем вычитания кюветы сравнения и подбора экспериментальных данных сенсограммы с допущением взаимодействия 1:1, применяя программное обеспечение BIAevaluation (GE, BR-1005-97).

30 **Результаты**

Аффинность, кинетику ассоциации и диссоциации для связывания PD-1 человека, обезьяны и мыши с антителами против PD-1 (273_C12_C05 (исходным клоном) и 273_C01_A12) определяли, применяя поверхностный плазмонный резонанс (ППР) (фигура 1, таблица 1). Также осуществляли контроль антителом против PD-1 ниволумабом (фигура 1, таблица 1). Измерили аффинность (KD) антитела против PD-1 273_C12_C05 (исходного клона) к PD-1 человека, яванского макака и мыши, и она составляла 3,84 нМ, 8,77 нМ и 6,4 мкМ, соответственно. Измерили аффинность (KD) антитела против PD-1 273_C01_A12 к PD-1 человека и яванского макака, и она составляла 10 нМ и 21 нМ, соответственно.

273_C01_A12 не связывало PD-1 мыши. Наблюдали хорошую аппроксимацию результатов для всех сенсограмм BIAcore, и низкие значения хи-квадрат и U-критерия свидетельствовали о точном подборе кривой. Аффинности антител против PD-1 273_C12_C05 (исходного клона) и 273_C01_A12 к PD-1 яванского макака находились в пределах 2,3- и 2,1-кратной аффинности к PD-1 человека, соответственно (таблица 2).

Два варианта антитела 273_C12_C05 (исходного клона), а именно 273_C12_C05 (вариант 1) и 273_C12_C05 (вариант 2), также исследовали, применяя поверхностный плазмонный резонанс. Данные антитела также применяли в формате IgG2. Аффинности связывания PD-1 человека, обезьяны и мыши у данных двух вариантов антител были такими же, как и у 273_C12_C05 (исходного клона).

Таблица 1. Аффинности антител против PD-1 273_C12_C05, 273_C01_A12 и ниволумаба к PD-1 человека, яванского макака и мыши, определенные с помощью спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Аппроксимацию и статистику рассчитывали, применяя программное обеспечение BIAcore T100 Evaluation. KD - равновесная константа диссоциации (нМ); k_a - константа ассоциации ($M^{-1}s^{-1}$); k_d - константа диссоциации (s^{-1}); Rмакс - максимальный уровень связывания лиганда в единицах ответа (RU); значение χ^2 (или χ^2) - представляет собой стандартную статистическую меру точности подбора кривой, при этом более низкое значение указывает на лучший подбор.

Антитело	Виды	K _D (нМ)	k_a ($M^{-1}s^{-1} \times 10^5$)	k_d ($s^{-1} \times 10^{-4}$)	Rмакс (RU)	U-значение	χ^2
273_C01_A12	Человек	10	6,06	61	15,87	1,86	0,062
	Макак	21	5,48	115	14,85	2,41	0,083
	Мышь	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
273_C12_C05	Человек	3,8	3,92	15	17,69	1,43	0,078
	Макак	8,7	3,87	34	17,54	1,43	0,098
	Мышь	6,4 μ M	0,01	35,74	382,6	19,6	0,48
Ниволумаб	Человек	3,76	1,39	5,23	19,47	2,41	0,07
	Макак	5,22	1,89	9,9	21,03	1,43	0,08

Таблица 2. Аффинность антитела против PD-1 273_C12_C05 и 273_C01_A12 к не относящемуся к человеку ортологу примата. Сравнение аффинности 273_C12_C05 и 273_C01_A12 к PD-1 человека и яванского макака.

Антитело	Виды	Kd (нМ)	Кратность различия
273_C01_A12	Человек	10	2,10
	Макак	21	
273_C12_C05	Человек	3,8	2,29
	Макак	8,7	

Связывание PD-1 человека, измеренное с помощью ELISA.

5

Материалы и методы

Исследовали способность культуральных супернатантов клеток млекопитающих, содержащих клоны IgG₂ (273_C12; исходный клон для 273_C12_C05 и 273_C01, исходный клон для 273_C01_A12), связывать PD-1 человека в ELISA на основе захвата (фигура 2). Для того чтобы нормировать на различия в экспрессии, использовали стратегию ELISA на основе захвата, в соответствии с которой планшеты ELISA изначально покрывали антителом против Fc. После захвата 273_C12 или 273_C01 (IgG₂) добавляли биотинилированный PD-1 (40 пМ) и инкубировали. Связывание PD-1 с иммобилизованным МАТ против PD-1 определяли, применяя меченый европием стрептавидин. Комбинация скрининга на основе захвата и низкой концентрации антигена обеспечила строгие условия для какого-либо связывания PD-1.

15

Дополнительные экспериментальные подробности данного анализа.

20

25

Черные иммуносорбционные планшеты (Nunc) покрывали в течение ночи Fc-специфичным антителом мыши против IgG человека (Jackson Labs, 209-005-098, 5 мкг/мл в ФБР, 50 мкл на лунку), лунки блокировали путем добавления 2% сухого молока (Marvel), ФБР (ФБР-М, 300 мкл на лунку). Планшеты промывали три раза ФБР-Т (ФБР, 0,1% Tween-20) и три раза ФБР, а затем добавляли различные разведения IgG против PD-1 в ФБР-М (50 мкл на лунку). Планшеты инкубировали в течение 1 часа, промывали, как описано выше, и добавляли биотинилированный PD-1-rCd4 (5 мкг/мл в ФБР-М, 50 мкл) в каждую лунку. Планшеты инкубировали в течение дополнительного часа, промывали и добавляли стрептавидин-Eu (Perkin Elmer, 1 мкг/мл, ФБР-М, 50 мкл), инкубировали в течение 30 минут, промывали, добавляли усиливающий раствор DELFIA (50 мкл) и прочитывали планшеты на

спектрофотометре для прочтения планшетов Fusion Perkin Elmer (возбуждение на 320 нм, испускание на 620 нм).

Результаты

5 Применяя данный подход, для обоих 273_C12 (296063 единицы) и 273_C01 (317070 единиц) продемонстрировали связывание с PD-1 человека. Более того, для 273_C12 также продемонстрировали связывание с PD-1 мыши (82081 единица).

Нативное связывание (проточная цитометрия).

10

Материалы и методы

Клетки Jurkat дикого типа или клетки Jurkat, экспрессирующие PD-1 (клетки Jurkat NFAT-luc2/PD-1, Promega, CS187102), подсчитывали и разделяли на аликвоты по 1×10^6 клеток на образец. Клетки промывали 1х ФБР, 0,1% БСА и ресуспендировали в 1х ФБР, 1% БСА (100 мкл), в который добавляли антитело против PD-1 (10 нм), и инкубировали в течение 1 часа при 4°C. Клетки промывали, как описано выше, ресуспендировали в 1х ФБР, 1% БСА (100 мкл), в который добавляли антитело против Fc-PE (Biolegend, M1310G05), 0,5 мкл и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. Клетки промывали, как описано выше, ресуспендировали в 1х ФБР, 0,1% БСА (50 мкл) и добавляли 1 мкл Topro3 (ThermoFisher Scientific, T3605) для определения жизнеспособности клеток. Окрашенные клетки анализировали, применяя проточный цитометр IntelliCyt iQue.

20

Результаты.

25

Использовали проточную цитометрию, чтобы оценить связывание ниволумаба, 273_C01_A12 и 273_C12_C05 с экспрессирующими PD-1 клетками Jurkat (фигура 3). Клетки Jurkat ДТ не экспрессируют PD-1 (фигура 3А), что показано по отсутствию связывания с доступным для приобретения антителом против PD-1, меченым фикоэритрином (PE) (Biolegend, eBioJ105), тогда как для клона Jurkat, сконструированного для конститутивной экспрессии PD-1, выявили сильный сдвиг в интенсивности флуоресценции после добавления антитела против PD-1-PE, что указывало на связывание антитела с PD-1, экспрессированным на данных клетках. Следовательно, экспрессирующие PD-1 клетки Jurkat использовали для исследования связывания описанных выше клонов антител против PD-1 с экспрессированным на поверхности клеток PD-1 и клетки Jurkat ДТ использовали в качестве отрицательного контроля для связывания антитела. Исходное антитело против PD-1 – ниволумаб - использовали в качестве положительного контроля и антитело против лизоцима

35

(D1.3) служило в качестве неспецифического контрольного антитела. Не наблюдали сдвига в интенсивности флуоресценции, когда 273_C01_A12, 273_C12_C05 и ниволумаб инкубировали с клетками Jurkat ДТ, что свидетельствовало об отсутствии связывания (фигура 3В); тогда как наблюдали сдвиг, когда 273_C01_A12, 273_C12_C05 и ниволумаб инкубировали с экспрессирующими PD-1 клетками Jurkat (фигура 3С), что свидетельствовало о специфическом связывании с клетками, экспрессирующими PD-1. Неспецифическое антитело против лизоцима (D1.3) не связывалось ни с клетками Jurkat ДТ, ни с экспрессирующими PD-1 клетками Jurkat (фигура 3В и 3С).

10 **Блокирование *in vitro***

Исследовали способность антител против PD-1 (IgG₂) 273_C12_C05 и 273_C01_A12 ингибировать взаимодействие PD-1 и PD-L1 в биохимическом анализе связывания лиганда (фигура 4А).

15 **Материалы и методы.**

Черные иммуносорбционные 96-луночные планшеты (Nunc) покрывали в течение ночи антителом против rCD4 (MCA1022RY, Biotec/Serotec; 5 мкг/мл в ФБР) при 4°C, промывали три 20 раза ФБР, а затем блокировали путем добавления 200 мкл 3% (масса/объем) сухого молока (Marvel) в ФБР (ФБР-М) с последующей инкубацией в течение часа при комнатной температуре. Планшеты промывали три раза ФБР, а затем добавляли PD-L1-rCD4 (5 мкг/мл в М-ФБР, 50 мкл) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали три раза ФБР-Т (0,1% Tween-20, ФБР) и три раза ФБР. В результате этого PD-L1- 25 rCD4 был иммобилизован на планшете ELISA посредством антитела против rCD4. В отдельном планшете PD-1-Fc (0,8 нМ) смешивали в присутствии (серии концентраций) или отсутствие различных концентраций антитела против PD-1 (273_C12_C05, 273_C01_A12 или ниволумаба) в ФБР-М и инкубировали в течение 30 минут. После промывки планшета ELISA (три раза ФБР-Т и три раза ФБР) для удаления избытка не связанного PD-L1-rCD4, добавляли 30 в планшет ELISA предварительно смешанные PD-1-Fc и инкубировали в течение 1 часа. Любые присутствующие блокирующие антитела будут связывать эпитоп на PD-1, отвечающий за связывание PD-L1, и предотвращать их взаимодействие. Связывание PD-1-Fc с иммобилизованным PD-L1-rCD4 детектировали, применяя биотинилированное антитело против Fc человека (конъюгированное с биотином-SP антитело козы к IgG Fc человека, AffiniPure, Jackson ImmunoResearch Labs, 109-065-098, 50 мкл, 0,5 мкг/мл в ФБР-М). Планшеты промывали три раза ФБР-Т и три раза ФБР, а затем добавляли меченый европием стрептавидин (Perkin Elmer, 1244-360, 50 мкл, 0,5 мкг/мл в ФБР-М). Планшеты промывали три 35

раза ФБР-Т и три раза ФБР, а затем добавляли усиливающий раствор DELFIA (4001-0010, Perkin Elmer, 50 мкл) и прочитывали планшеты с помощью спектрофотометра для прочтения планшетов BMG labtech PHERAstar (возбуждение на 340 нм, испускание на 615 нм).

5 Результаты

Все антитела 273_C12_C05, 273_C01_A12 и ниволумаб блокировали взаимодействие PD-L1 с PD-1 на 99 % (например, когда применяли концентрацию антител 8 нМ) (фигуры 4В и 4С). Тем не менее, интересно, что при более низких исследованных концентрациях антитела (0,5 нМ и 1 нМ), для 273_C12_C05 и 273_C01_A12 продемонстрировали улучшенное ингибирование взаимодействия PD-1/PD-L1 по сравнению с ниволумабом. Например, при концентрации антитела 0,5 нМ наблюдали приблизительно 75% ингибирование взаимодействия PD-1/PD-L1 антителами 273_C12_C05 и 273_C01_A12, тогда как наблюдали лишь приблизительно 50% ингибирование взаимодействия PD-1/PD-L1 ниволумабом. При концентрации антитела 1 нМ наблюдали приблизительно 99% ингибирование взаимодействия PD-1/PD-L1 антителами 273_C12_C05 и 273_C01_A12, тогда как наблюдали лишь приблизительно 80% ингибирование взаимодействия PD-1/PD-L1 ниволумабом.

Основанный на клеточной системе репортерный анализ блокирования PD-L1/PD-1

20 Описание анализа

Исследовали способность антител против PD-1 (IgG₂) 273_C12_C05 и 273_C01_A12 ингибировать взаимодействие PD-1 и PD-L1 в анализе, основанном на клеточной системе, с использованием биолюминесцентного репортера (Promega). В данном анализе используют два типа клеток: клетки HEK293, экспрессирующие PD-L1, и Т-клетки Jurkat, экспрессирующие PD-1, - и репортер NFAT на основе люциферазы. Комплексы TCR (Т-клеточного рецептора), присутствующие на клетках Jurkat, полностью активируются при взаимодействии с активирующим TCR комплексом, присутствующим на клетках HEK293, что приводит к конститутивной активности репортера NFAT на основе люциферазы. Совместное культивирование двух указанных линий клеток (клеток HEK293, экспрессирующих PD-L1, и Т-клеток Jurkat, экспрессирующих PD-1) приводит к взаимодействию PD-1/PD-L1, которое ингибирует активацию TCR и вызывает угнетающую регуляцию/подавление активности репортера NFAT на основе люциферазы; инкубация блокирующего антитела против PD-1 с клетками HEK293 перед совместным культивированием предотвращает связывание PD-1 с PD-L1, позволяя активацию TCR и приводя к последующей активности репортера NFAT на основе люциферазы.

Дополнительные экспериментальные подробности анализа совместного культивирования

Анализ проводили, следуя инструкциям производителя для линии клеток Jurkat, стабильно экспрессирующей NFAT-luc2/PD-1, GloResponse™ (Promega, CS187102) и клеток PD-L1 Thaw-and-Use (Promega, CS178103). Один флакон клеток PD-L1 размораживали и добавляли в среду для восстановления (14,5 мл, 90% HAM'S-F12, 10% ЭБС), по 100 мкл распределяли по 96-луночному аналитическому планшету (Costar, номер в каталоге 3917) и инкубировали в течение от 16 до 20 часов при 37°C, 5% CO₂. На следующий день флакон PD-1-репортерных клеток Jurkat Thaw-and-Use (Promega, CS187102) размораживали и добавляли в 5,9 мл аналитической среды (90% RPMI1640, 1% ЭБС). Аналитический планшет, содержащий прикрепившиеся клетки PD-L1, вынимали из термостата и удаляли среды с помощью пипетки с последующим переворачиванием планшета на бумажное полотенце. В планшет, содержащий прикрепившиеся клетки PD-L1, добавляли 40 мкл аналитических сред, содержащих различные разведения антитела (при 2х концентрации), а затем 40 мкл смеси клеток PD-1. Планшет инкубировали в течение 6 часов при 37°C, 5% CO₂. В каждую лунку добавляли реагент BioGlo (Promega, номер в каталоге G7940, 80 мкл) и считывали продукцию люциферазы, применяя BMG pherastar.

Проводили репортерный анализ PD-1/PD-L1, основанный на клеточной системе, ответа на дозу концентрации антитела против PD-1, экспериментальные результаты аппроксимировали (сигмоидальная кривая доза-ответ - переменная крутизна), применяя GraphPad Prism, и получали значения EC₅₀ для каждого антитела (фигура 5).

Результаты.

Проанализированные антитела действительно приводили к стимуляции активности репортера NFAT на основе люциферазы, указывая на блокирование взаимодействия PD-1/PD-L1. 273_C12_C05 (A) и 273_C01_A12 (B) продемонстрировали EC₅₀ 9,35 и 11,7 нМ, соответственно. Высокие значения R² свидетельствуют о хорошей аппроксимации экспериментальных результатов.

Два варианта антител, родственных 273_C12_C05 (исходному клону), а именно, 273_C12_C05 (вариант 1) и 273_C12_C05 (вариант 2), также исследовали в данном репортерном анализе блокирования PD-1/PD-L1, основанном на клеточной системе. Данные антитела также применяли в формате IgG₂. Наблюдали, что у двух данных вариантов антител

ингибиторная активность в отношении PD-1/PD-L1 была такой же, как у 273_C12_C05 (исходного клона).

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Actigen Ltd

<120> Антитела против PD-1

<130> 69.15.126518/01

<150> GB1618833.6

<151> 2016-11-08

<160> 100

<170> PatentIn версии 3.5

<210> 1

<211> 363

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 1

gaggtgcagc tcgtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggctcctc cgtgaagggtg 60

tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc agctactatg tgcattgggt ccgacaggcc 120

ccaggccagg gcctggaatg gatgggcggc atcatcccca tcttcggcac cgccaactac 180

gccagaaat tccaggcgag agtgaccatc accgccgacg agtccacctc caccgcctac 240

atggaactgt cctccctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggacctg 300

cacggctact cctacggcta ccccggtat tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360

tct 363

<210> 2

<211> 336

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 2

gacatcgtga tgaccagtc cccctgtcc ctgccgtga ccctgggcca gcctgcctcc 60

atctcctgcc ggtcctccca gtccctggtg taccacgacg gcaacaccta cctgaactgg 120

ttccagcagc ggccaggcca gtcccctcgg cggctgatct acgaggtgtc caaccgggac 180

tctggcgtgc ccgacagatt ctccggctcc ggcagcgaca ccgacttcac cctgaagatc 240

agccgggtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcagggcgc ctaccggccc 300

ctgaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaag 336

<210> 3

<211> 121

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 3

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu His Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Pro Gly Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4

<211> 112

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 4

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

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

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Ala Tyr Arg Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 5
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 5

Ser Tyr Tyr Val His
1 5

<210> 6
<211> 17
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 6

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 7
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 7

Asp Leu His Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Pro Gly Tyr
1 5 10

<210> 8
<211> 16
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 8

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr His Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 9
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 9

Glu Val Ser Asn Arg Asp Ser
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 10

Met Gln Gly Ala Tyr Arg Pro Leu Thr
1 5

<210> 11
<211> 30
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 11

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

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

<210> 12
<211> 14
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 12

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

<210> 13
<211> 32
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 13

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 14
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 14

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 15
<211> 23
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 15

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 16
<211> 15
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 16

Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 17
<211> 32
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 17

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 18
<211> 10
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 18

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 19
<211> 363
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 19
gaggtgcagc tcgtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggctcctc cgtgaagggtg 60
tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc agctactatg tgcattgggt ccgacaggcc 120
ccaggccagg gcctggaatg gatgggcggc atcatcccca tcttcggcac cgccaactac 180
gccagaaat tccagggcag agtgaccatc accgccgacg agtccaccga caccgcctac 240
atggaactgt cctccctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggacctg 300
cacggctact cctacggcta ccccggtat tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
tct 363

<210> 20
<211> 336
<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 20

gacatcgtga tgaccagtc cccctgtcc ctgcccgtga ccctgggcca gcctgcctcc 60

atctcctgcc ggtcctccca gtccctggtg taccacgacg ccaacaccta cctgaactgg 120

ttccagcagc ggccaggcca gtcccctcgg cggctgatct acgaggtgtc caaccgggac 180

tctggcgtgc cgcacagatt ctccgggtcc ggcagcgaca ccgacttcac cctgaagatc 240

agccgggtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcagggcgc ctaccggccc 300

ctgaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaag 336

<210> 21

<211> 121

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 21

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu His Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Pro Gly Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22

<211> 112

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 22

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

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

Asp Ala Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Ala Tyr Arg Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 23

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 23

Ser Tyr Tyr Val His
1 5

<210> 24

<211> 17

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 24

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 25
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 25

Asp Leu His Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Pro Gly Tyr
1 5 10

<210> 26
<211> 16
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 26

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr His Asp Ala Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 27
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 27

Glu Val Ser Asn Arg Asp Ser
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 28

Met Gln Gly Ala Tyr Arg Pro Leu Thr
1 5

<210> 29
<211> 30
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 29

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

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

<210> 30
<211> 14
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 30

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

<210> 31
<211> 32
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 31

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asp Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 32
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 32

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 33
<211> 23
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 33

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 34

<211> 15

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 34

Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 35

<211> 32

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 35

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 36

<211> 10

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 36

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 37

<211> 363

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность антитела

<400> 37
 gaggtgcagc tcgtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggctcctc cgtgaagggtg 60
 tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc agctactatg tgcattgggt ccgacaggcc 120
 ccaggccagg gcctggaatg gatgggaggc atcatcccca tcttcggcac cgccaactac 180
 gccagaaat tccagggcag agtgaccatc accgccgacg agtccatctc caccgcctac 240
 atggaactgt cctccctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggacctg 300
 cacggctact cctacggcta ccccggtat tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
 tct 363

<210> 38
 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность антитела

<400> 38
 gacatcgtga tgaccagtc cccctgttcc ctgccgtga ccctggggcca gcctgcctcc 60
 atctcctgcc ggtcctccca gtcctgtgtg taccacgacg ccaacaccta cctgaactgg 120
 ttccagcagc ggccaggcca gtccctcggc cggctgatct acgagggtgtc caaccgggac 180
 tctggcgtgc ccgacagatt ctccggctcc ggcagcgaca ccgacttcac cctgaagatc 240
 agccgggtgg aagccgagga cgtgggctgt tactactgca tgcagggcgc ctaccggccc 300
 ctgaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaag 336

<210> 39
 <211> 121
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность антитела

<400> 39

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu His Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Pro Gly Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40

<211> 112

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 40

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

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

Asp Ala Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Ala Tyr Arg Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 41

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 41

Ser Tyr Tyr Val His
1 5

<210> 42

<211> 17

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 42

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 43

<211> 12

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 43

Asp Leu His Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Pro Gly Tyr
1 5 10

<210> 44

<211> 16

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 44

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr His Asp Ala Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 45

<211> 7

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 45

Glu Val Ser Asn Arg Asp Ser

1

5

<210> 46
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 46

Met Gln Gly Ala Tyr Arg Pro Leu Thr
1 5

<210> 47
<211> 30
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 47

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

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

<210> 48
<211> 14
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 48

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

<210> 49
<211> 32
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 49

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 50
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 50

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 51
<211> 23
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 51

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 52
<211> 15
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 52

Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 53
<211> 32
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 53

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys

<210> 54
 <211> 10
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность антитела

<400> 54

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 55
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность антитела

<400> 55
 gaggtgcagc tcgtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggctcctc cgtgaagggtg 60
 tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc agctactatg tgcattgggt ccgacaggcc 120
 ccaggccagg gcctggaatg gatgggcggc atcatcccca tcttcggcac cgccaactac 180
 gccagaaat tccagggcag agtgaccatc accgccgacg agtccatctc caccgcctac 240
 atggaactgt cctccctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggacctg 300
 cacggctact cctacggcta ccccggtat tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
 tct 363

<210> 56
 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность антитела

<400> 56
 gacatcgtga tgaccagtc cccctgtcc ctgcccgtga ccctgggcca gcctgcctcc 60
 atctcctgcc ggtcctccca gtccctggtg tactccgacg ccaacaccta cctgaactgg 120
 ttccagcagc ggctggcca gtcccctcgg cggctgatct acgaggtgtc caaccgcgag 180
 tctggcgtgc ccgacagatt ctccggctcc ggctctgcca ccgacttcac cctgaagatc 240
 agccgggtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcagggcac ccagctgccc 300
 ctgaccttcg gcggaggcac caaggtggaa atcaag 336

<210> 57

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

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 57

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu His Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Pro Gly Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 58
<211> 112
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 58

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asp Ala Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Glu Ser Gly Val Pro

50

55

60

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

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

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

<210> 59
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность антитела

<400> 59

Ser Tyr Tyr Val His
 1 5

<210> 60
 <211> 17
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность антитела

<400> 60

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 61
 <211> 12
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность антитела

<400> 61

Asp Leu His Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Pro Gly Tyr
 1 5 10

<210> 62
 <211> 16
 <212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 62

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	Tyr	Ser	Asp	Ala	Asn	Thr	Tyr	Leu	Asn
1				5					10					15	

<210> 63

<211> 7

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 63

Glu	Val	Ser	Asn	Arg	Glu	Ser
1			5			

<210> 64

<211> 9

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 64

Met	Gln	Gly	Thr	Gln	Leu	Pro	Leu	Thr
1				5				

<210> 65

<211> 30

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 65

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

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

<210> 66

<211> 14

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 66

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

<210> 67

<211> 32

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 67

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 68

<211> 11

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 68

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 69

<211> 23

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 69

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 70

<211> 15

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 70

Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 71

<211> 32

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 71

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 72

<211> 10

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 72

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 73

<211> 16

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Хаа может представлять собой любую аминокислоту

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Хаа может представлять собой любую аминокислоту

<400> 73

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Xaa Asp Xaa Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 74
<211> 16
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa представляет собой H или S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Xaa представляет собой G или A

<400> 74

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Xaa Asp Xaa Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 75
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa может представлять собой любую аминокислоту

<400> 75

Glu Val Ser Asn Arg Xaa Ser
1 5

<210> 76
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa представляет собой D или E

<400> 76

Glu Val Ser Asn Arg Xaa Ser
1 5

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

<220>
<223> Последовательность антитела

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4) .. (4)
<223> Xaa может представлять собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5) .. (5)
<223> Xaa может представлять собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> Xaa может представлять собой любую аминокислоту

<400> 77

Met Gln Gly Xaa Xaa Xaa Pro Leu Thr
1 5

<210> 78
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4) .. (4)
<223> Xaa представляет собой A или T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5) .. (5)
<223> Xaa представляет собой Y или Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> Xaa представляет собой R или L

<400> 78

Met Gln Gly Xaa Xaa Xaa Pro Leu Thr
1 5

<210> 79
<211> 32
<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Хаа может представлять собой любую аминокислоту

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Хаа может представлять собой любую аминокислоту

<400> 79

Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Xaa	Xaa	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu
1				5					10					15	

Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 80

<211> 32

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Хаа представляет собой Т или I

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Хаа представляет собой S или D

<400> 80

Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Xaa	Xaa	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu
1				5					10					15	

Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 81

<211> 113

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 81

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

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
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 Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn 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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 82

<211> 111

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 82

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

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
20 25 30

Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

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

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

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp

85

90

95

Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 83

<211> 439

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 83

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

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
 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 Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn 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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

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

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160

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

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln
 180 185 190

Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	195	200	205	
Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	210	215	220	
Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	225	230	235	240
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	245	250	255	
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	260	265	270	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	275	280	285	
Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	290	295	300	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Ala	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	305	310	315	320
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	325	330	335	
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	340	345	350	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	355	360	365	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	370	375	380	
Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	385	390	395	400
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	405	410	415	
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	420	425	430	
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										435			

<210> 84
<211> 216
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 84

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

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
20 25 30

Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

<210> 85
 <211> 447
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность антитела

<400> 85

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu His Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Pro Gly 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

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

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

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 86
<211> 219
<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 86

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

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

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Ala Tyr Arg Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 87

<211> 1341
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 87

gaggtgcagc tcgtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggctcctc cgtgaagggtg	60
tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc agctactatg tgcattgggt ccgacaggcc	120
ccaggccagg gcctggaatg gatggggcggc atcatcccca tcttcggcac cgccaactac	180
gccagaaat tccagggcag agtgaccatc accgccgacg agtccacctc caccgcctac	240
atggaactgt cctccctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggacctg	300
cacggctact cctacggcta ccccggtat tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc	360
tctgcctcca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc cctgcagcag aagcaccagc	420
gagagcaccg ccgccctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg	480
agctggaaca gcggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccctgccgt gctgcagagc	540
agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg accgtgcccc gcagcaactt cggcaccag	600
acctacacct gcaacgtgga ccacaagccc agcaaacacca aggtggacaa gaccgtggag	660
agaaagtgct gcgtggagtgc cctccctgc cccgctcccc ctgtggctgg ccccagcgtg	720
ttcctgttcc ctccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc	780
tgctggtcg tggacgtgag ccacgaggac cccgaggtgc agttcaactg gtacgtggac	840
ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg agcagttcaa cagcaccttc	900
agagtggatga gcgtgctgac cgtggtgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag	960
tgcaaggatga gcaacaagg cctgcccgc cccatcgaga agaccatcag caagaccaag	1020
ggccagccca gagagcccca ggtgtacacc ctgcccccta gcagagagga gatgaccaag	1080
aaccaggatga gcctgacctg cctggtgaag ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag	1140
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccat gctggacagc	1200
gacggcagct tcttcctgta cagcaagctg accgtggaca agagcagatg gcagcagggc	1260
aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc	1320
ctgagcctga gccccggcaa g	1341

<210> 88
<211> 657
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 88

gacatcgtga tgaccagtc cccctgtcc ctgccgtga ccctgggcca gcctgcctcc	60
atctcctgcc ggtcctccca gtccctggtg taccacgacg gcaacaccta cctgaactgg	120
ttccagcagc ggccaggcca gtcccctcgg cggctgatct acgaggtgtc caaccgggac	180
tctggcgtgc ccgacagatt ctccggctcc ggcagcgaca ccgacttcac cctgaagatc	240
agccgggtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcagggcgc ctaccggccc	300
ctgaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaagcgaa ccgtggcgcg tcccagcgtg	360
ttcatcttcc ctcccagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgcctg	420
ctgaacaact tctacccag agaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag	480
agcggcaaca gccaggagag cgtgaccgag caggacagca aggacagcac ctacagcctg	540
agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgctgcgag	600
gtgaccacc agggcctgag cagccccgtg accaagagct tcaacagagg cgagtgc	657

<210> 89
 <211> 447
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность антитела

<400> 89

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu His Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Pro Gly 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

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

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

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 90

<211> 219

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 90

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

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

Asp Ala Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Ala Tyr Arg Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

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

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145		150		155		160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser						
		165		170		175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu						
		180		185		190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser						
		195		200		205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys						
		210		215		

<210> 91
 <211> 1341
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность антитела

<400> 91
 gaagtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggctcctc cgtgaagggtg 60
 tcctgcaagg cctccggcta cacctttacc agctactacg tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacagg gcctggaatg gatgggcggc atcatcccca tcttcggcac cgccaactac 180
 gccagaaat tccagggcag agtgaccatc accgccgacg agtctaccga caccgcctac 240
 atggaactgt cctccctgcg gagcgaggac accgccgtgt actattgcgc cagagatctg 300
 cacggctact cctacggcta ccccggtat tggggacagg gcaccctcgt gacagtgtcc 360
 tccgcttcta ccaagggccc cagcgtgttc cctctggccc cttgctccag atccacctcc 420
 gagtctacag ccgccctggg ctgcctcgtg aaggactact ttcctgagcc cgtgaccgtg 480
 tcttggaact ctggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tccctgctgt gctgcagtcc 540
 tccggcctgt acagcctgtc cagcgtcgtg actgtgcctt cctccaactt tggcaccag 600
 acctacacct gtaacgtgga ccacaagccc tccaacacca aagtggacaa gaccgtggaa 660
 cggaagtgtc gcgtggaatg ccccccttgt cctgcccctc ctgtggctgg cccttcctgt 720
 ttctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc tgaagtgacc 780
 tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggac cccgaggtgc agttcaattg gtacgtggac 840
 ggcgtggaag tgcacaatgc caagaccaag cccagagagg aacagttcaa cagcaccttc 900
 cgggtggtgt ccgtgctgac cgtggtgcat caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960
 tgcaaagtgt ccaacaaggg cctgcctgcc cccatcgaaa agaccatctc taagaccaag 1020
 ggacagcccc gcgagcctca ggtgtacaca ctgcccccta gccgggaaga gatgaccaag 1080

aaccaggtgt	ccctgacctg	tctcgtgaaa	ggcttctacc	cttccgatat	cgccgtggaa	1140
tgggagtcca	acggccagcc	cgagaacaac	tacaagacca	cccccccat	gctggactcc	1200
gatggctcat	tcttcttgta	ctccaagctg	actgtggaca	agtcccgggtg	gcagcagggc	1260
aacgtgttct	cctgctccgt	gatgcacgag	gccctgcaca	accactacac	ccagaagtcc	1320
ctgtccctga	gccccggcaa	a				1341

<220>
<223> Последовательность антитела

<210>	93
<211>	447
<212>	ПРТ
<213>	Искусственная последовательность

<400> 93

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu His Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Pro Gly 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

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

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

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 94
<211> 219
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 94

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

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

Asp Ala Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65		70		75		80									
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Gly
			85					90						95	
Ala	Tyr	Arg	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100				105					110			
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
		115					120					125			
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
	130					135					140				
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
145					150					155					160
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
			165						170					175	
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
			180					185					190		
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
		195					200					205			
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
	210					215									

<210> 95
 <211> 1341
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность антитела

<400> 95	
gaggtgcagc tcgtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggctcctc cgtgaagggtg	60
tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc agctactatg tgcattgggt ccgacaggcc	120
ccaggccagg gcctggaatg gatgggcggc atcatcccca tcttcggcac cgccaactac	180
gccagaaat tccagggcag agtgaccatc accgccgacg agtccatctc caccgcctac	240
atggaactgt cctccctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggacctg	300
cacggctact cctacggcta ccccggtat tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc	360
tctgcctcca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc cctgcagcag aagcaccagc	420
gagagcaccg ccgccctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg	480

agctggaaca gcggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tccctgccgt gctgcagagc	540
agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg accgtgccc a gcagcaactt cggcaccag	600
acctacacct gcaacgtgga ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaccgtggag	660
agaaagtgct gcgtggagtgc cctccctgc cccgctcccc ctgtggctgg cccagcgtg	720
ttcctgttcc ctcccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc	780
tgcgtggtcg tggacgtgag ccacgaggac cccgaggtgc agttcaactg gtacgtggac	840
ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg agcagttcaa cagcaccttc	900
agagtggatga gcgtgctgac cgtggtgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag	960
tgcaaggatga gcaacaaggc cctgcccgc cccatcgaga agaccatcag caagaccaag	1020
ggccagccca gagagcccca ggtgtacacc ctgcccccta gcagagagga gatgaccaag	1080
aaccaggatga gcctgacctg cctggtgaag ggcttctacc ccagcgacat cggcgtggag	1140
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccat gctggacagc	1200
gacggcagct tcttcctgta cagcaagctg accgtggaca agagcagatg gcagcagggc	1260
aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc	1320
ctgagcctga gccccggcaa g	1341

<210> 96
 <211> 657
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность антитела

<400> 96	
gacatcgtga tgaccagtc cccctgtcc ctgcccgtga ccttgggcca gcctgcctcc	60
atctcctgcc ggtcctccca gtccctggtg taccacgacg ctaacaccta cctgaactgg	120
ttccagcagc ggccaggcca gtcccctcgg cggctgatct acgaggtgtc caaccgggac	180
tctggcgtgc ccgacagatt ctccggctcc ggcagcgaca ccgacttcac cctgaagatc	240
agccgggtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcagggcgc ctaccggccc	300
ctgaccttcg gccagggcac caagggtgaa atcaagcgaa ccgtggccgc tcccagcgtg	360
ttcatcttcc ctcccagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgcctg	420
ctgaacaact tctaccccag agaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag	480
agcggcaaca gccaggagag cgtgaccgag caggacagca aggacagcac ctacagcctg	540
agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaagggtgta cgccctgcag	600
gtgaccacc agggcctgag cagccccgtg accaagagct tcaacagagg cgagtgc	657

<210> 97

<211> 447
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность антитела

<400> 97

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu His Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Pro Gly 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

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

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

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 98

<211> 219

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 98

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asp Ala Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 99

<211> 1341

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 99

gaggtgcagc tcgtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac cgggctcctc cgtgaagggtg	60
tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc agctactatg tgcattgggt ccgacaggcc	120
ccaggccagg gcctggaatg gatgggcggc atcatcccca tcttcggcac cgccaactac	180
gcccagaaat tccagggcag agtgaccatc accgccgacg agtccatctc caccgcctac	240
atggaactgt cctccctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggacctg	300
cacggctact cctacggcta ccccggtat tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc	360
tctgcctcca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc cctgcagcag aagcaccagc	420
gagagcaccg ccgccctggg ctgcctgggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg	480
agctggaaca gcggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccctgccgt gctgcagagc	540
agcggcctgt acagcctgag cagcgtgggtg accgtgcccc gcagcaactt cggcaccag	600
acctacacct gcaacgtgga ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaccgtggag	660
agaaagtgct gcgtggagtg ccctccctgc cccgctcccc ctgtggctgg ccccgagctg	720
ttctgttcc ctcccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc	780
tgcgtggctg tggacgtgag ccacgaggac cccgaggtgc agttcaactg gtacgtggac	840
ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg agcagttcaa cagcaccttc	900
agagtgggtg gcgtgctgac cgtggtgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag	960
tgcaagggtg gcaacaaggg cctgcccgcc cccatcgaga agaccatcag caagaccaag	1020
ggccagccca gagagcccca ggtgtacacc ctgcccccta gcagagagga gatgaccaag	1080
aaccagggtg gcctgacctg cctggtgaag ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag	1140
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccat gctggacagc	1200
gacggcagct tcttcctgta cagcaagctg accgtggaca agagcagatg gcagcagggc	1260
aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc	1320
ctgagcctga gccccggcaa g	1341

<210> 100

<211> 657

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность антитела

<400> 100

gacatcgtga tgaccagtc ccccctgtcc ctgcccgtga ccctgggcca gcctgcctcc	60
atctcctgcc ggtcctccca gtccctgggtg tactccgacg ccaacaccta cctgaactgg	120

ttccagcagc	ggcctggcca	gtccccctcg	cggctgatct	acgaggtgtc	caaccgcgag	180
tctggcgtgc	ccgacagatt	ctccggctcc	ggctctgcca	ccgacttcac	cctgaagatc	240
agccgggtgg	aagccgagga	cgtgggcgtg	tactactgca	tgcagggcac	ccagctgccc	300
ctgaccttcg	gcggaggcac	caaggtggaa	atcaagcgaa	ccgtggccgc	tcccagcgtg	360
ttcatcttcc	ctcccagcga	cgagcagctg	aagagcggca	ccgccagcgt	gggtgtgcctg	420
ctgaacaact	tctaccccag	agaggccaag	gtgcagtgga	aggtggacaa	cgccctgcag	480
agcggcaaca	gccaggagag	cgtgaccgag	caggacagca	aggacagcac	ctacagcctg	540
agcagcacc	tgaccctgag	caaggccgac	tacgagaagc	acaaggtgta	cgcttgcgag	600
gtgaccacc	agggcctgag	cagccccgtg	accaagagct	tcaacagagg	cgagtgc	657

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывается с PD-1 и которое содержит по меньшей мере одну
 5 переменную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR, и по меньшей мере одну
 переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR, при этом указанная
 переменная область тяжелой цепи содержит:
- (a) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который имеет
 последовательность аминокислот SEQ ID NO: 5, или последовательность, по существу
 10 гомологичную указанной последовательности,
 - (b) CDR2 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 6, или
 последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности, и
 - (c) CDR3 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 7, или
 последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности; и/или
 при этом указанная переменная область легкой цепи содержит:
 - 15 (d) CDR1 переменной области легкой цепи (VL), который имеет
 последовательность аминокислот SEQ ID NO: 26, или последовательность, по
 существу гомологичную указанной последовательности,
 - (e) CDR2 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 9, или
 последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности, и
 - 20 (f) CDR3 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 10, или
 последовательность, по существу гомологичную указанной последовательности;
 при этом указанная по существу гомологичная последовательность представляет
 собой последовательность, содержащую 1, 2 или 3 замены аминокислот по сравнению с
 данной последовательностью CDR, или при этом указанная по существу гомологичная
 25 последовательность представляет собой последовательность, содержащую консервативные
 замены аминокислот в данной последовательности CDR.
2. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что указанная переменная область легкой цепи
 содержит:
- 30 (i) CDR1 переменной области легкой цепи (VL) с последовательностью аминокислот
 R S S Q S L V Y X₉ D X₁₁ N T Y L N (SEQ ID NO: 73),
 где X₉ может представлять собой любую аминокислоту, предпочтительно Н или S;
 X₁₁ может представлять собой любую аминокислоту, предпочтительно G или A;
 - 35 (ii) CDR2 VL с последовательностью аминокислот E V S N R X₆ S (SEQ ID NO: 75);
 где X₆ может представлять собой любую аминокислоту, предпочтительно D или E; и

(iii) CDR3 VL с последовательностью аминокислот M Q G X₄ X₅ X₆ P L T (SEQ ID NO: 77),

где X₄ может представлять собой любую аминокислоту, предпочтительно A или T;

X₅ может представлять собой любую аминокислоту, предпочтительно Y или Q;

5 X₆ может представлять собой любую аминокислоту, предпочтительно R или L.

3. Антитело по п. 1 или п. 2, отличающееся тем, что указанное антитело содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR, и по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR, при этом
10 указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(a) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 5,

(b) CDR2 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 6, и

(c) CDR3 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 7; и

15 при этом указанная переменная область легкой цепи содержит:

(d) CDR1 переменной области легкой цепи (VL), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 26,

(e) CDR2 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 9, и

(f) CDR3 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 10.

20

4. Антитело по п. 1 или п. 2, отличающееся тем, что указанное антитело содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR, и по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR, при этом
указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

25 (a) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 5,

(b) CDR2 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 6, и

(c) CDR3 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 7; и

при этом указанная переменная область легкой цепи содержит:

30 (d) CDR1 переменной области легкой цепи (VL), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 8,

(e) CDR2 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 9, и

(f) CDR3 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 10.

35 5. Антитело по п. 1 или п. 2, отличающееся тем, что указанное антитело содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR, и по

меньшей мере одну переменную область легкой цепи, которая содержит три CDR, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(a) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 5,

(b) CDR2 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 6, и

(c) CDR3 VH, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 7; и

при этом указанная переменная область легкой цепи содержит:

(d) CDR1 переменной области легкой цепи (VL), который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 62,

(e) CDR2 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 63, и

(f) CDR3 VL, который имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 64.

6. Антитело по любому из пп. 1, 2 или 4, отличающееся тем, что переменная область легкой цепи имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 4 или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности, и/или тем, что переменная область тяжелой цепи имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 3 или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности.

7. Антитело по любому из пп. 1, 2 или 3, отличающееся тем, что переменная область легкой цепи имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 22 или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности, и/или тем, что переменная область тяжелой цепи имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 21 или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности.

8. Антитело по любому из пп. 1, 2 или 3, отличающееся тем, что переменная область легкой цепи имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 40 или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности, и/или тем, что переменная область тяжелой цепи имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 39 или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности.

9. Антитело по любому из пп. 1, 2 или 5, отличающееся тем, что переменная область легкой цепи имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 58 или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности, и/или тем, что переменная область тяжелой цепи имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 57

или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности.

10. Антитело по п. 6, отличающееся тем, что переменная область легкой цепи имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 4, и тем, что переменная область тяжелой цепи имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 3.

11. Антитело по п. 7, отличающееся тем, что переменная область легкой цепи имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 22, и тем, что переменная область тяжелой цепи имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 21.

12. Антитело по п. 8, отличающееся тем, что переменная область легкой цепи имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 40, и тем, что переменная область тяжелой цепи имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 39.

13. Антитело по п. 9, отличающееся тем, что переменная область легкой цепи имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 58, и тем, что переменная область тяжелой цепи имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 57.

14. Антитело по любому из пп. 1, 2, 4, 6 или 10, отличающееся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 85, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности, и/или легкую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 86, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности.

15. Антитело по п. 14, отличающееся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 85, и легкую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 86.

16. Антитело по любому из пп. 1, 2, 3, 7 или 11, отличающееся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 89, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности, и/или легкую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 90, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности.

17. Антитело по п. 16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 89, и легкую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 90.

5

18. Антитело по любому из пп. 1, 2, 3, 8 или 12, отличающееся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 93, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности, и/или легкую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 94, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности.

10

19. Антитело по п. 18, отличающееся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 93, и легкую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 94.

15

20. Антитело по любому из пп. 1, 2, 5, 9 или 13, отличающееся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 97, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности, и/или легкую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 98, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную указанной последовательности.

20

21. Антитело по п. 20, отличающееся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 97, и легкую цепь, которая включает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 98.

25

22. Иммуноконъюгат, содержащий антитело по любому из пп. 1 - 21, присоединенное к терапевтическому агенту.

30

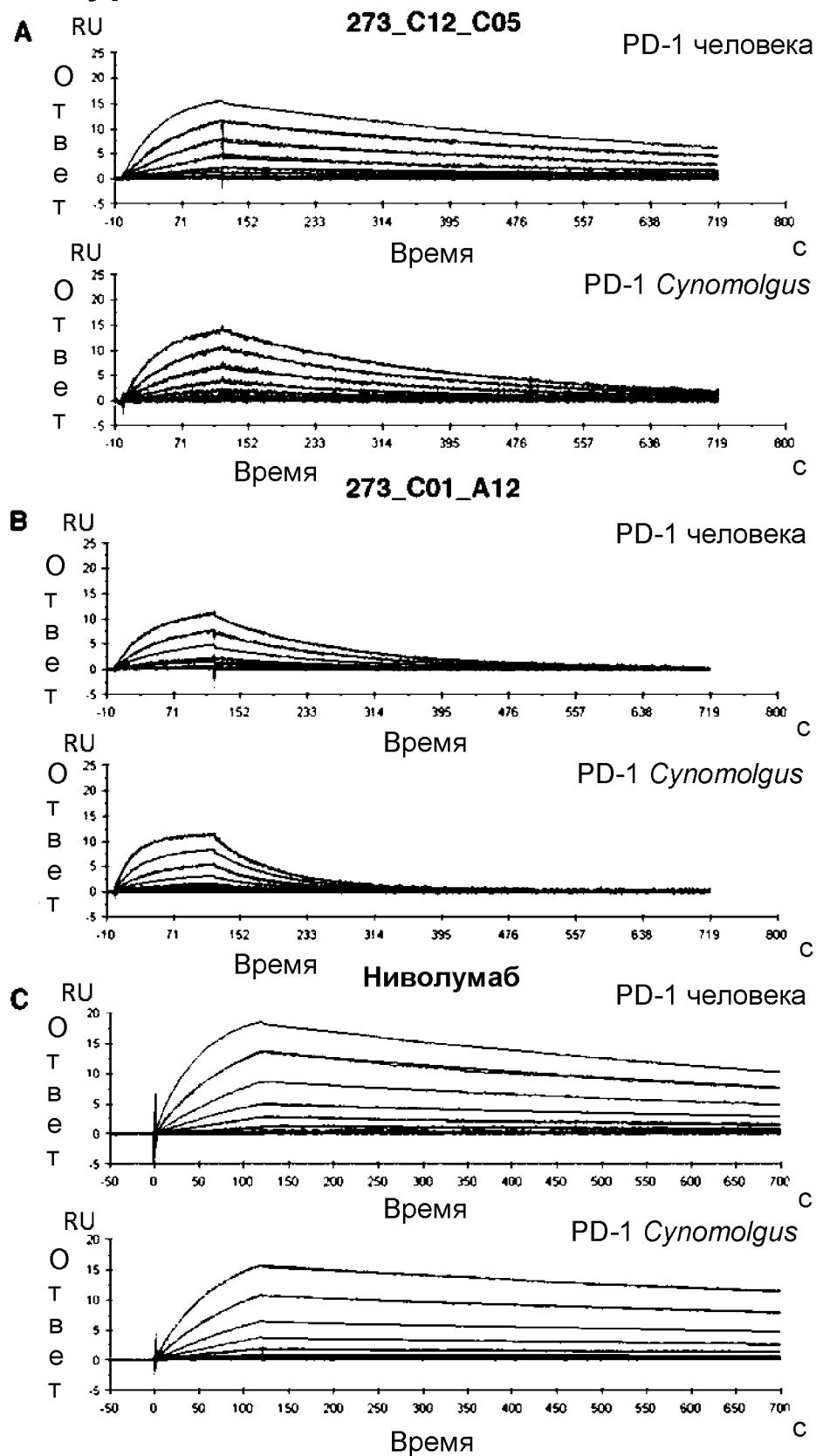
23. Композиция, содержащая по меньшей мере первое антитело по любому из пп. 1 - 21 или его иммуноконъюгат, предпочтительно указанная композиция представляет собой фармацевтически приемлемую композицию.

35

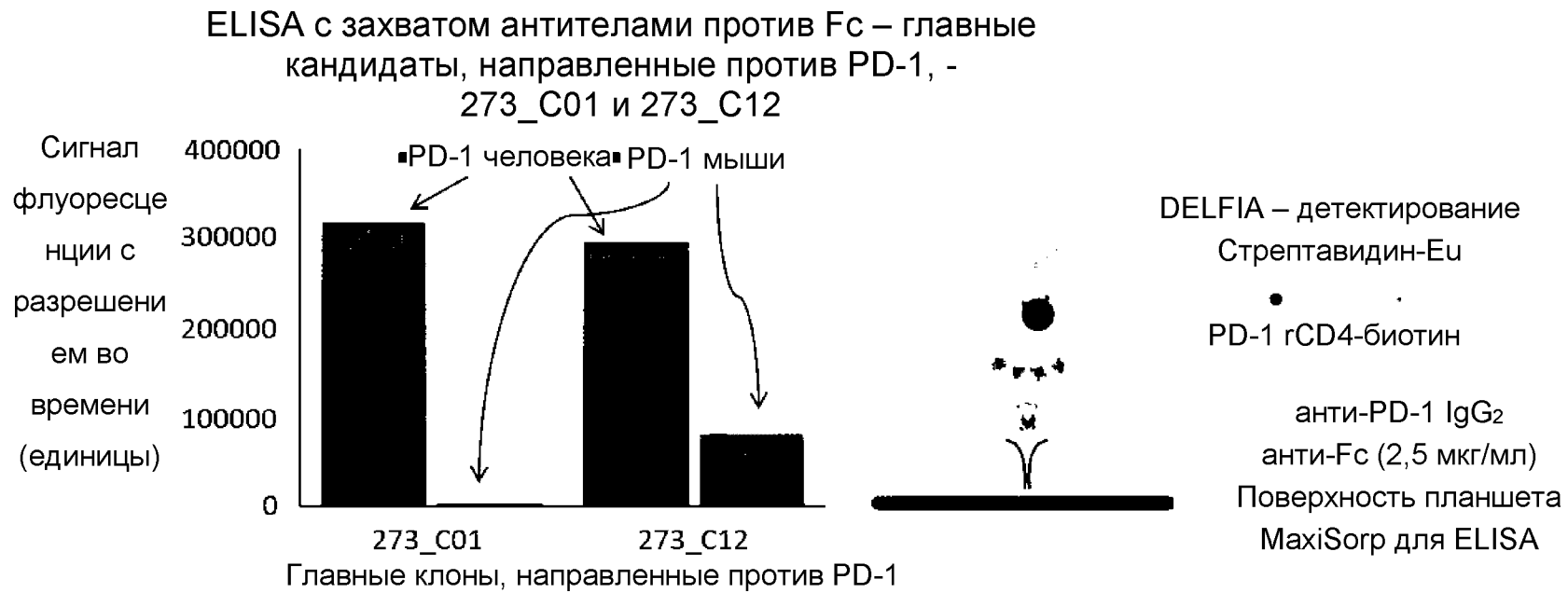
24. Молекула нуклеиновой кислоты, включающая последовательность нуклеотидов, которая кодирует антитело согласно любому из пп. 1 - 21.

25. Способ получения антитела согласно любому из пп. 1 - 21, включающий следующие этапы:
- (i) культивирование клетки-хозяина, содержащей одну или более молекул нуклеиновых кислот, кодирующих антитело согласно любому из пп. 1 – 21, или один или более рекомбинантных векторов экспрессии, содержащих одну или более из указанных молекул нуклеиновых кислот, при условиях, подходящих для экспрессии кодируемого антитела; и
 - (ii) выделение или получение антитела или белка из указанной клетки-хозяина или из ростовой среды/супернатанта.
- 10 26. Антитело согласно любому из пп. 1 - 21 или его иммуноконъюгат для применения в терапии.
- 15 27. Антитело или его иммуноконъюгат по п. 26 для применения в терапии по п. 26, отличающееся тем, что указанная терапия представляет собой лечение рака или лечение расстройства иммунной системы.
28. Антитело или его иммуноконъюгат по п. 26 для применения в терапии по п. 26, отличающееся тем, что указанная терапия представляет собой лечение рака.
- 20 29. Способ лечения рака или расстройства иммунной системы, указанный способ включает введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела согласно любому из пп. 1 - 21, или его иммуноконъюгата.
- 25 30. Применение антитела, описанного в любом из пп. 1 - 21, или его иммуноконъюгата при изготовлении лекарственного средства для применения в терапии, предпочтительно указанная терапия представляет собой лечение рака или лечение расстройства иммунной системы.

Фигура 1

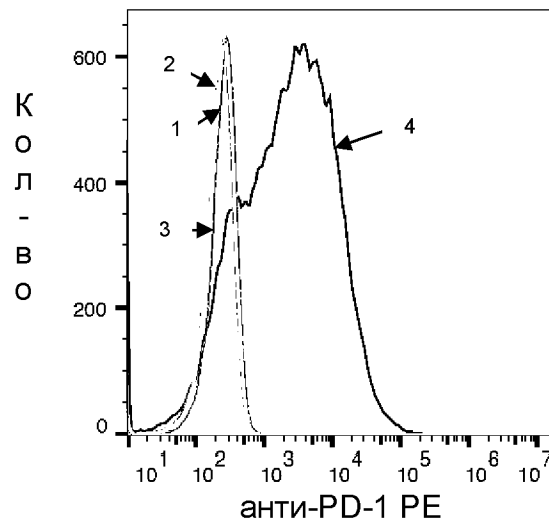


Фигура 2



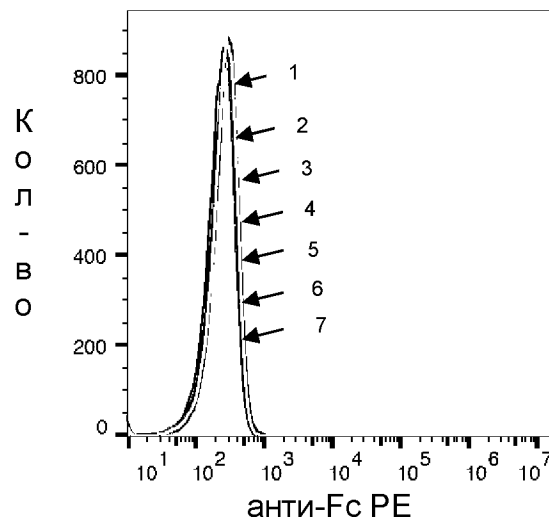
Фигура 3

A



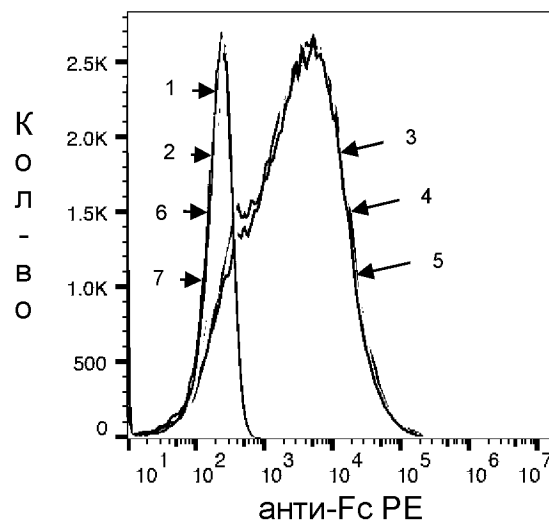
Название образца	
Jurkat ДТ неокраш.	1
Jurkat ДТ+анти-PD-1 PE	2
PD1 Jurkat неокраш.	3
PD1 Jurkat +анти-PD-1 PE	4

B



Название образца	
Jurkat ДТ Д1.3+анти-Fc-PE	1
Jurkat ДТ ниволумаб неокраш.	2
Jurkat ДТ ниволумаб +анти-Fc-PE	3
Jurkat ДТ 273 C12 C05+анти-Fc-PE	4
Jurkat ДТ 273 C01 A12+анти-Fc-PE	5
Jurkat ДТ +анти-Fc-PE	6
Jurkat ДТ неокраш.	7

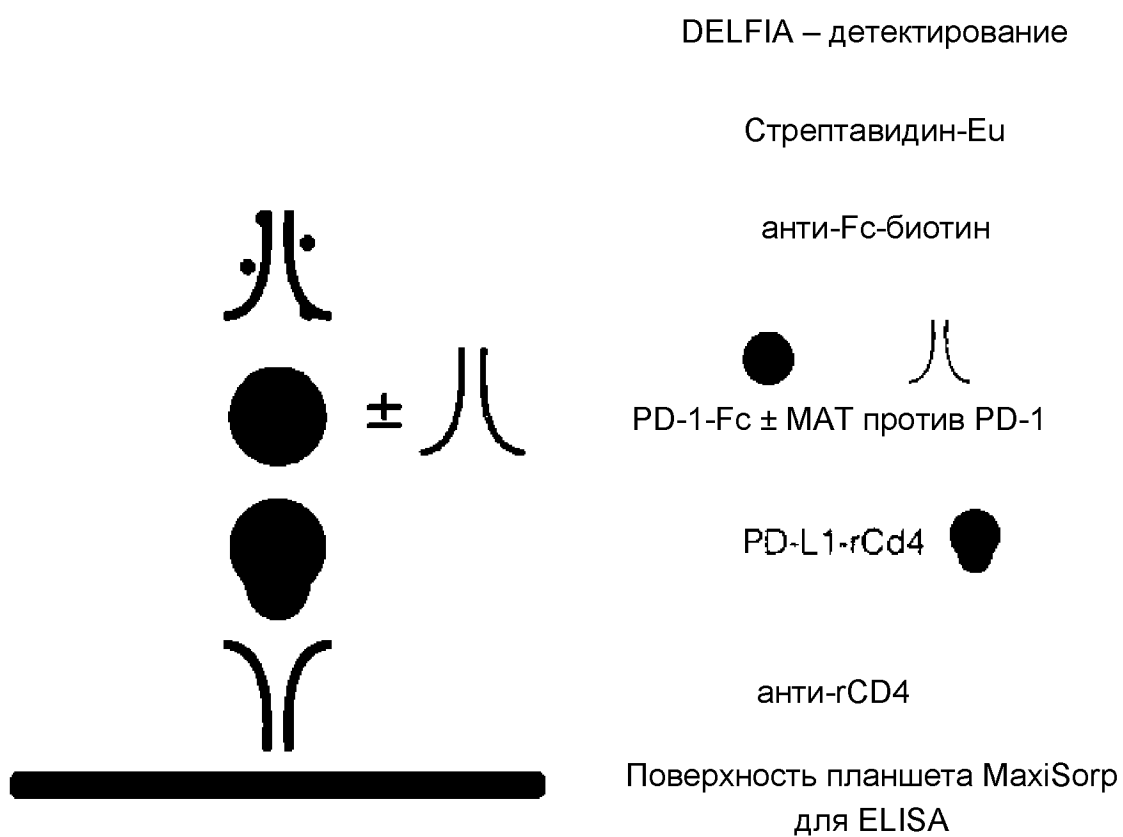
C



Название образца	
Jurkat PD1 Д1.3+анти-Fc-PE	1
Jurkat PD1 ниволумаб неокраш.	2
Jurkat PD1 ниволумаб +анти-Fc-PE	3
Jurkat PD1 273 C12 C05+анти-Fc-PE	4
Jurkat PD1 273 C01 A12+анти-Fc-PE	5
Jurkat PD1 +анти-Fc-PE	6
Jurkat PD1 неокраш.	7

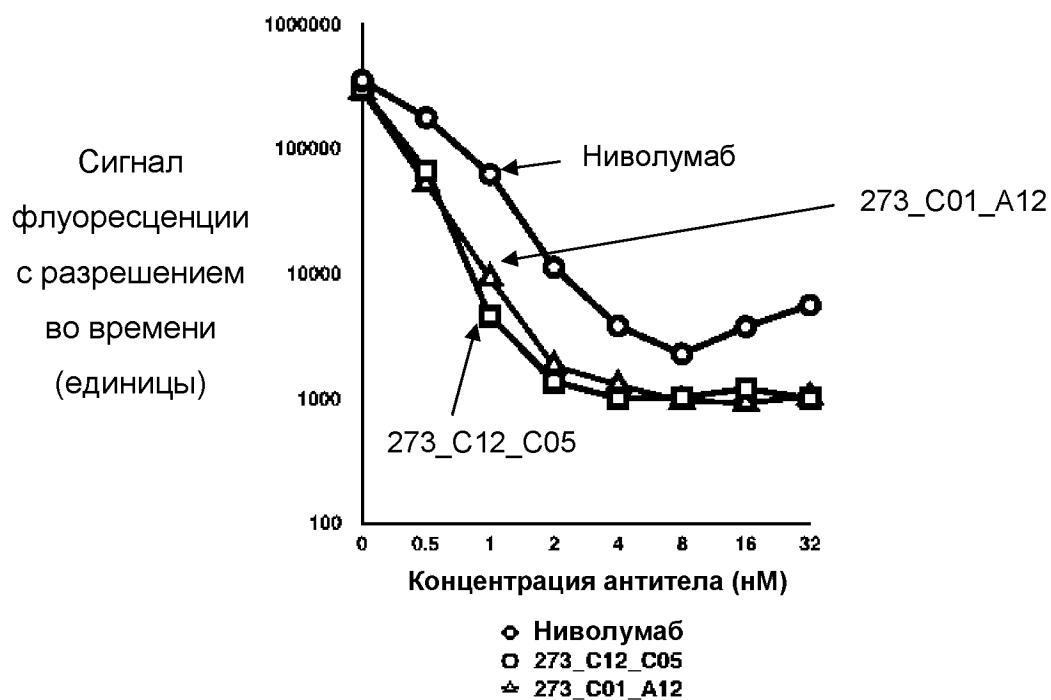
Фигура 4

A

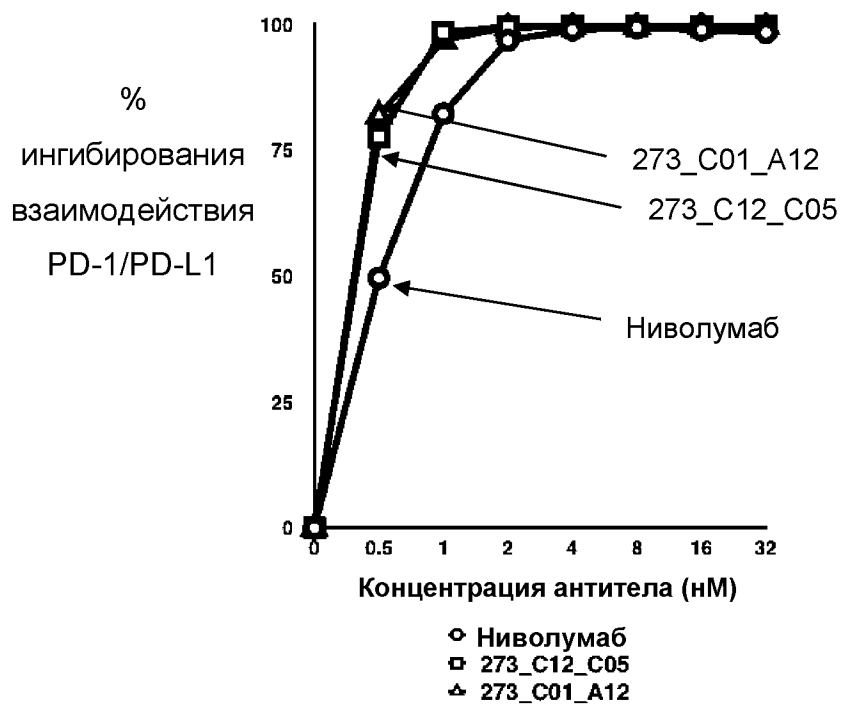


Фигура 4 (продолжение)

В



С



Фигура 5

