

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21)

201991243

(13)

A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2019.11.29

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 51/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2017.12.01

---

(54) МЕЧЕННЫЕ РАДИОАКТИВНОЙ МЕТКОЙ АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-L1 ДЛЯ  
ИММУНО-ПЭТ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

---

(31) 62/428,672; 62/457,267; 62/569,773

(57) В настоящем документе представлены меченные радиоактивной меткой антитела против PD-L1 и их применение в иммуно-ПЭТ визуализации. Представлены способы выявления присутствия белков PD-L1 у больного или в образце.

(32) 2016.12.01; 2017.02.10; 2017.10.09

(33) US

(86) PCT/US2017/064215

(87) WO 2018/102682 2018.06.07

(71) Заявитель:

РЕГЕНЕРОН ФАРМАСҮОТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Келли Маркус, Ма Дангше, Olson  
Уильям, Терстон Гэвин (US)

(74) Представитель:

Угрюмов В.М., Глухарёва А.О.,  
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,  
Лебедев В.В., Костюченкова М.Ю.,  
Гизатуллин Ш.Ф., Парамонова К.В.  
(RU)

201991243

A1

A1

201991243

# **МЕЧЕННЫЕ РАДИОАКТИВНОЙ МЕТКОЙ АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-L1 ДЛЯ ИММУНО-ПЭТ ВИЗУАЛИЗАЦИИ**

## **ОПИСАНИЕ**

### **Область техники, к которой относится настоящее изобретение**

**[001]** Настоящее раскрытие относится к меченным радиоактивной меткой антителам против PD-L1 и к их применению в иммуно-ПЭТ визуализации.

### **Перечень последовательностей**

**[002]** Официальная копия перечня последовательностей предоставляется одновременно с описанием в электронном виде через EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII с названием файла «10305WO01\_SEQ\_LIST\_ST25.txt», датой создания 01 декабря 2017 года и размером приблизительно 117 КБ. Перечень последовательностей, содержащийся в этом отформатированном документе ASCII, является частью описания и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

**[003]** Лиганд 1 программируемой смерти клетки (PD-L1) (также называемый B7-H1 или CD274) представляет собой лиганд белкового рецептора из 290 аминокислот, широко экспрессируемый как в лимфоидных, так и в нелимфоидных тканях, таких как CD4 и CD8 Т-клетки, макрофагальные клеточные линии, в периферических тканях, а также в опухолевых клетках и инфицированных вирусом клетках (Dong et al 1999, Nature Med.). PD-L1 связывается с рецепторами PD-1 и B7-1, которые принадлежат к семейству CD28/CTLA-4 (цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген)/ICOS (индуциальный сопрессор) Т-клеточных соингибиторных рецепторов (Chen et al 2013, Nature Rev. Immunol. 13: 227-242), и ослабляет иммунный ответ путем ингибирования активации Т-клеток. PD-L1, связывающийся с PD-1 или B7-1, приводит к пониженной Т-клеточной пролиферации и секреции цитокинов, нарушению гуморального и клеточного иммунного ответа при таких заболеваниях, как злокачественная опухоль и вирусная инфекция. Экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках и инфицированных вирусом клетках используется опухолями и хроническими вирусными инфекциями, чтобы избежать

иммунного ответа. PD-L1 экспрессируется в самых разных опухолях, и исследования на животных моделях показали, что PD-L1 в опухолях ингибитирует активацию Т-клеток и лизис опухолевых клеток и может привести к повышенной гибели опухолеспецифических Т-клеток. При хронических вирусных инфекциях PD-L1, экспрессируемый на инфицированных вирусом клетках, связывается с PD-1 на вирус-специфических Т-клетках, и эти Т-клетки становятся «истощенными» с потерей эффекторных функций и пролиферативной способности (Freeman 2008, PNAS 105: 10275-10276). Система PD-1:PD-L1 также играет важную роль в индуцированном развитии Т-регуляторных (Treg) клеток и в поддержании функции Treg (Francisco et al 2010, Immunol. Rev. 236: 219-242). Блокирование PD-L1 антагонистами, включая моноклональные антитела, было изучено при лечении рака и хронических вирусных инфекций (Ribas 2012, NEJM 366: 2517-2519; Freeman 2008, PNAS 105: 10275-10276; Sheridan 2012, Nature Biotechnology 30: 729-730).

**[004]** Имуно-позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) представляет собой диагностический инструмент для визуализации, который использует моноклональные антитела, меченные позитронными излучателями, сочетая целевые свойства антитела с чувствительностью камер позитронно-эмиссионной томографии. См., например, *The Oncologist*, 12: 1379 (2007); *Journal of Нипрозрачный Medicine*, 52(8): 1171 (2011). Имуно-ПЭТ обеспечивает визуализацию и количественную оценку накопления антигенов и антител *in vivo* и, как таковой, может служить важным инструментом для диагностики и дополнения терапии. Например, иммуно-ПЭТ может помочь в выборе потенциальных больных-кандидатов для конкретной терапии, а также в мониторинге лечения.

**[005]** Поскольку и PD1, и PD-L1 появились в качестве целей для иммунотерапии, существует потребность в диагностических инструментах для терапии на основе антител против PD1 и/или антител против PD-L1, в том числе, среди прочего, в диагностических инструментах, которые позволяют выявлять подходящих больных-кандидатов на указанную терапию.

### **Краткое раскрытие настоящего изобретения**

**[006]** Настоящее раскрытие включает в себя меченные радиоактивной меткой коньюгаты антитела против PD-L1 для применения в иммуно-ПЭТ визуализации.

**[007]** Согласно одному аспекту коньюгат содержит антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, хелатирующий фрагмент и позитронный излучатель.

**[008]** В настоящем документе также представлены процессы синтеза указанных коньюгатов и синтетические промежуточные соединения, применимые для этого.

[009] В настоящем документе также представлены способы визуализации ткани, которая экспрессирует PD-L1, при этом способы предусматривают введение меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела против PD-L1, описываемого в настоящем документе, в ткань и визуализацию экспрессии PD-L1 с помощью визуализации позитронной эмиссионной томографией (ПЭТ).

[010] В настоящем документе также представлены способы выявления PD-L1 в ткани, при этом способы предусматривают введение меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела против PD-L1, описываемого в настоящем документе, в ткань и визуализацию экспрессии PD-L1 с помощью ПЭТ визуализации. Согласно одному варианту осуществления ткань находится в субъекте-человеке. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является отличное от человека млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет заболевание или нарушение, такое как злокачественная опухоль, воспалительное заболевание или инфекция.

[011] Согласно некоторым аспектам субъекту вводят дозу 5 мг, или 10 мг, или 20 мг меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела против PD-L1.

[012] В настоящем документе также представлены способы идентификации больного, подходящего для противораковой терапии, включающей в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1, при этом способы предусматривают отбор больного с солидной опухолью, введение меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела, описываемого в настоящем документе, и визуализацию введенного меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоль с помощью ПЭТ визуализации, при этом наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли идентифицирует больного как подходящего для противораковой терапии, включающей в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1.

[013] В настоящем документе также представлены способы лечения опухоли, при этом способы предусматривают отбор субъекта с солидной опухолью; определение того, что солидная опухоль является PD-L1-позитивной; и введение противораковой терапии субъекту, нуждающемуся в этом. Согласно некоторым вариантам осуществления противораковая терапия включает в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 (например, антитело против PD-1 или антитело против PD-L1). Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту вводят меченный радиоактивной меткой конъюгат антитела, описываемый в настоящем документе, и визуализируют локализацию меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела путем визуализации позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ) для определения, является ли опухоль PD-L1-

позитивной.

**[014]** В настоящем документе также представлены способы мониторинга эффективности противораковой терапии у субъекта, при этом способы предусматривают отбор субъекта с солидной опухолью, при этом субъект получает лечение противораковой терапией; введение субъекту меченного радиоактивной меткой конъюгата, описываемого в настоящем документе; визуализацию локализации введенного меченного радиоактивной меткой конъюгата в опухоль с помощью ПЭТ визуализации и определение роста опухоли, при этом уменьшение от исходного уровня поглощения конъюгата или меченного радиоактивной меткой сигнала указывает на регрессию и эффективность противораковой терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления противораковая терапия включает в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 (например, антитело против PD-1).

**[015]** В настоящем документе также представлены способы прогнозирования ответа больного на противораковую терапию, включающую в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1, при этом способы предусматривают отбор больного с солидной опухолью и определение того, является ли опухоль PD-L1-позитивной, при этом если опухоль является PD-L1-позитивной, это указывает на позитивный ответ больного на противораковую терапию, включающую в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления опухоль определяют как позитивную путем введения меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в соответствии с настоящим раскрытием и визуализируют локализацию меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ визуализации, при этом наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является PD-L1-позитивной.

### **Краткое описание графических материалов**

**[016]** На **фиг. 1** изображены SDS-PAGE и SEC немодифицированного антитела против PD-L1 и модифицированного DFO антитела против PD-L1.

**[017]** На **фиг. 2А и 2В** изображена радио-SEC-HPLC после мечения радиоактивной меткой  $^{89}\text{Zr}$  для исследования 1.

**[018]** На **фиг. 3** изображена радио-SEC-HPLC DFO-конъюгата (антитела против PD-L1) после мечения радиоактивной меткой  $^{89}\text{Zr}$  для исследования 2.

**[019]** На **фиг. 4** изображена радио-SEC-HPLC SEC после мечения радиоактивной меткой  $^{89}\text{Zr}$  для исследования 3.

[020] На **фиг. 5** изображена хроматограмма UV280-SEC-HPLC и меченое вещество радио-iTLC после мечения радиоактивной меткой  $^{89}\text{Zr}$  для исследования 1.

[021] На **фиг. 6А, 6В, 6С и 6Д** показана экспрессия hPD-L1 линиями опухолевых клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1-/hPD-L1<sup>Tg</sup> (фиг. **6А**), LOX-IMVI (фиг. **6В**), MDA-MB-231 (фиг. **6С**) и SK-Br-3 (фиг. **6Д**) *in vitro*, как описывается в примере 5 настоящего документа.

[022] На **фиг. 7** показана экспрессия hPD-L1 опухолевыми клетками MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1-/hPD-L1<sup>Tg</sup> и LOX-IMVI с или без лечения интерфероном-гамма *in vitro* во втором эксперименте, как описывается в примере 5 настоящего документа.

[023] На **фиг. 8** показаны хроматограммы, полученные с помощью анализа SEC-HPLC с использованием образцов из радиоиммуноконъюгатных препаратов конъюгата  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 для исследований, показанных на А, В, Д и Е, и изотипного контрольного радиоиммуноконъюгата  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG4<sup>P</sup> для исследований, показанных на С и F. Хроматограммы для поглощения при 280 нм показаны на А-С, а радиохроматограммы для интенсивности  $\gamma$ -эмиссии показаны на D-F. На А-С также выявляли элюирование буферных компонентов. Эти пики солей в буфере для образцов (время удержания > 25 минут, звездочка «\*») были исключены из интеграции площадей пиков. Пики метили для обозначения HMW (высокомолекулярного) иммуноконъюгата («1»), мономерного иммуноконъюгата («2»), невключенного  $^{89}\text{Zr}$  («3») и солей в буфере для образца («\*»). Сокращения: mAU = миллиединицы поглощения; cps = число импульсов в секунду.

[024] На **фиг. 9** представлены данные биораспределения *ex vivo* для конъюгата  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 у мышей *PD-1hu/hu-PD-L1hu/hu*. Шестнадцати мышам (2 группы по 8 животных в каждой) вводили однократную IV дозу 50 мкКи (1 мг/кг) конъюгата  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 в день 0 и забивали их в день 6 (черные столбцы) или день 10 (серые столбцы) после введения дозы. Кровь, собранную посредством пункции сердца, и указанные собранные ткани взвешивали и определяли радиоактивность. Процент инъецируемой дозы на грамм (% ID/г) для отдельных образцов, собранных в день 6 или 10, рассчитывали относительно радиоактивности стандарта дозы из инъецируемого материала (конъюгат  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1) и массы отдельных образцов. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  SD.

### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

#### **I. Определения**

[025] Если в настоящем документе не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же самое значение, что обычно известно

рядовому специалисту в области, к которой относится раскрываемый заявляемый объект.

**[026]** Термин «PD-L1» относится к лиганду 1 программируемой смерти, также известному как CD274 и B7H1. Аминокислотная последовательность полноразмерного PD-L1 представлена в GenBank под регистрационным номером NP\_054862.1. Термин «PD-L1» также включает в себя варианты белка PD-L1. Термин «PD-L1» включает в себя рекомбинантный PD-L1 или его фрагмент. Термин также предусматривает PD-L1 или его фрагмент, соединенный, например, с гистидиновой меткой, Fc мыши или человека или сигнальной последовательностью, такой как ROR1. Например, термин включает в себя последовательности, содержащие Fc мыши (mIgG2a) или Fc человека (hlgGl) на C-конце, соединенные с аминокислотными остатками 19-239 полноразмерного PD-L1 (NP\_054862.1). Варианты белка содержат гистидиновую метку на C-конце, соединенную с аминокислотными остатками 19-239 NP\_054862.1. Если не указано происхождение от отличного от человека вида, термин «PD-L1» означает PD-L1 человека. PD-L1 представляет собой белок из 290 аминокислот с внеклеточным IgV-подобным и IgC-подобным доменами (аминокислоты 19-239 полноразмерного PD-L1), трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом из приблизительно 30 аминокислот. PD-L1 конститутивно экспрессируется на многих клетках, таких как антигенпрезентирующие клетки (например, дендритные клетки, макрофаги и В-клетки) и на гемопоэтических и негемопоэтических клетках (например, клетках сосудистого эндотелия, островках поджелудочной железы и сайтах иммунных привилегий). PD-L1 также экспрессируется в широком ряду опухолей и инфицированных вирусом клетках и представляет собой компонент иммуносупрессорной среды (Ribas 2012, NEJM 366: 2517-2519). PD-L1 связывается с одним из двух соингибиторов Т-клеток PD-1 и B7-1.

**[027]** Термин «PD-1» относится к белку программируемой смерти 1, Т-клеточному соингибитору, также известному как CD279. Аминокислотная последовательность полноразмерного PD-1 представлена в GenBank под регистрационным номером NP\_005009.2. Термин также включает в себя PD-1 или его фрагмент, соединенный, например, с гистидиновой меткой, Fc мыши или человека или сигнальной последовательностью, такой как ROR1. Например, термин включает в себя последовательности, содержащие Fc мыши (mIgG2a) или Fc человека (hlgGl) на C-конце, соединенные с аминокислотными остатками 25-170 NPJ305009.2 с заменой C93S. PD-1 представляет собой представителя семейства CD28/CTLA-4/ICOS Т-клеточных соингибиторов. PD-1 представляет собой белок из 288 аминокислот с внеклеточным N-концевым доменом, который является IgV-подобным, трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом, содержащим тирозинсодержащий ингибирующий мотив

иммунорецептора (ITIM) и тирозинсодержащий свич-мотив иммунорецептора (ITSM) (Chattopadhyay et al 2009, Immunol. Rev.). Рецептор PD-1 характеризуется наличием двух лигандов PD-L1 и PD-L2.

**[028]** Термин «B7-1» относится к антигену активации Т-лимфоцитов, также известному как состимулирующий фактор CD80. B7-1 представляет собой мембранный рецептор из 288 аминокислот с внеклеточным N-концевым доменом, который содержит IgV-подобную (aa 37-138) и IgC-подобную (aa 154-232) области, трансмембранным доменом (aa 243-263) и С-концевой внутриклеточной областью (aa 263-288). Аминокислотная последовательность полноразмерного B7-1 представлена в GenBank под регистрационным номером NP\_005182.1.

**[029]** Используемый в настоящем документе термин «Т-клеточный соингибитор» относится к лиганду и/или рецептору, который модулирует иммунный ответ посредством Т-клеточной активации или супрессии. Термин «Т-клеточный соингибитор», также известный как Т-клеточная сосигнальная молекула, включает в себя без ограничения PD-1, белок гена активации лимфоцита 3 (LAG-3, также известный как CD223), антиген-4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4), аттенюатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA), CD-28, 2B4, LY108, Т-клеточный иммуноглобулин и муцин-3 (TIM3), Т-клеточный иммунорецептор с иммуноглобулином и ITIM (TIGIT; также известный как VSIG9), ассоциированный с лейкоцитами иммуноглобулиноподобный рецептор 1 (LAIR1; также известный как CD305), индуцируемый Т-клеточный состимулятор (ICOS; также известный как CD278), B7-1 (CD80) и CD160.

**[030]** Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи («HCVR» или «VH») и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи («LCVR» или «VL») и константной области легкой цепи (C<sub>L</sub>). Области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, которые называются каркасными областями (FR). Каждая из V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Согласно определенным вариантам осуществления FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) может быть идентичной последовательностям зародышевой линии человека или может быть естественным или искусственным путем модифицированной. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основании сравнительного анализа двух или более CDR.

[031] Также возможна замена одного или нескольких остатков CDR или пропуск одной или нескольких CDR. В научной литературе были описаны антитела, которые для связывания могут обходиться без одной или двух CDR. Padlan *et al.* (1995 FASEB J. 9:133-139) проанализировали контактные области между антителами и их антигенами на основании опубликованных кристаллических структур и пришли к выводу, что только приблизительно одна пятая - одна треть остатков CDR фактически контактирует с антигеном. Padlan также обнаружил многие антитела, в которых одна или две CDR не характеризуются наличием аминокислот в контакте с антигеном (см. также, Vajdos *et al.* 2002 J Mol Biol 320:415-428).

[032] Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, можно идентифицировать на основании предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 зачастую не являются необходимыми) из областей CDR согласно Kabat, лежащих за пределами CDR согласно Chothia, с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирически. Если CDR или ее остаток(остатки) пропущен(ы), как правило, они замещаются аминокислотой, занимающей соответствующее положение в другой последовательности антитела человека или консенсусе таких последовательностей. Положения для замены в пределах CDR и аминокислоты для замещения также могут быть выбраны эмпирически. Эмпирические замены могут являться консервативными или неконсервативными заменами.

[033] Раскрытые в настоящем документе полностью человеческие моноклональные антитела против PD-L1 могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR областях вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации можно легко выявить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрываемых в настоящем документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Согласно настоящему раскрытию предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые происходят из любой из аминокислотных последовательностей, раскрываемых в настоящем документе, при этом одна или несколько аминокислот в пределах одной или нескольких каркасных и/или CDR областей мутированы по отношению к соответствующему(им) остатку(ам) последовательности зародышевой линии, из которой произошло антитело, или по отношению к соответствующему(им) остатку(ам) другой последовательности зародышевой линии человека, или по отношению к консервативной аминокислотной замене соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения

последовательности в настоящем документе обобщенно называются «мутации зародышевой линии»). Специалист в данной области, начиная с раскрытых в настоящем документе последовательностей вариабельной области тяжелой и легкой цепей, сможет без труда получить различные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления все каркасные и/или CDR остатки в пределах доменов  $V_H$  и/или  $V_L$  мутируют обратно с получением остатков, встречающихся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой произошло антитело. Согласно другим вариантам осуществления только определенные остатки мутируют обратно по отношению к исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутированные остатки, встречающиеся в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только мутированные остатки, встречающиеся в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. Согласно другим вариантам осуществления один или несколько каркасных и/или CDR остатков мутируют по отношению к соответствующему(им) остатку(ам) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой изначально произошло антитело). Более того, антитела в соответствии с настоящим раскрытием могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасных и/или CDR областей, например, при этом определенные отдельные остатки мутируют по отношению к соответствующему остатку конкретной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются или мутируют по отношению к соответствующему остатку другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, можно легко тестировать в отношении одного или нескольких требуемых свойств, таких как, улучшенная специфичность связывания, увеличенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (если таковые имеются), сниженная иммуногенность и т. д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим способом, предусмотрены объемом настоящего раскрытия.

**[034]** Согласно настоящему изобретению также предусмотрены полностью человеческие моноклональные антитела против PD-L1, содержащие варианты любой из раскрываемых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, характеризующиеся одной или несколькими консервативными заменами. Например,

согласно настоящему раскрытию предусмотрены антитела против PD-L1, характеризующиеся аминокислотными последовательностями HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т. д., консервативными аминокислотными заменами относительно любой из раскрываемых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR.

**[035]** Предусмотрено, что используемый в настоящем документе термин «антитело человека» включает в себя антитела, характеризующиеся вариабельными и константными областями, происходящими из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. mAb человека в соответствии с настоящим раскрытием могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Тем не менее, не предусмотрено, что используемый в настоящем документе термин «антитело человека» включает в себя mAb, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих (например, мыши), были привиты на последовательности FR человека.

**[036]** Используемый в настоящем документе термин «мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы» относится к биспецифическим, триспецифическим или мультиспецифическим антигенсвязывающим молекулам и их антигенсвязывающим фрагментам. Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы могут являться специфическими в отношении различных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении эпитопов более чем одного целевого полипептида. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула может представлять собой отдельный мультифункциональный полипептид, или она может представлять собой мультимерный комплекс из двух или более полипептидов, которые ковалентно или нековалентно соединены друг с другом. Термин «мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы» включает в себя антитела в соответствии с настоящим раскрытием, которые могут быть связаны или могут соэкспрессироваться с другой функциональной молекулой, например, с другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, с помощью химического сочетания, генетического слияния, нековалентной связи или иным образом) с одним или нескольким другими молекулярными структурными единицами, такими как белок или его фрагмент, с получением биспецифической или мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы со второй специфичностью связывания. Согласно настоящему раскрытию термин

«мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы» также включает в себя биспецифические, триспецифические или мультиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Согласно определенным вариантам осуществления антитело в соответствии с настоящим раскрытием функционально связано с другим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом с получением биспецифического антитела со второй специфичностью связывания. Биспецифические и мультиспецифические антитела в соответствии с настоящим раскрытием описаны в другом месте в настоящем документе.

**[037]** Термин «специфически связывает» или «специфически связывается с» или подобное означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно стабильным при физиологических условиях. Специфические связывание можно охарактеризовать равновесной константой диссоциации, составляющей по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М или меньше (например, меньшая  $K_D$  означает более сильное связывание). Способы определения того, связываются ли две молекулы специфически, хорошо известны в уровне техники и включают в себя, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и подобное. Как описано в настоящем документе, с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE<sup>TM</sup>, были идентифицированы антитела, которые специфически связываются с PD-L1. Более того, мультиспецифические антитела, которые связываются с одним доменом в PD-L1 и одним или несколькими дополнительными антигенами, или биспецифические, которые связываются с двумя различными областями PD-L1, тем не менее, рассматривают как антитела, которые «специфически связывают», как используется в настоящем документе.

**[038]** Используемые в настоящем документе термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и подобное включают в себя любой встречающийся в природе, получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Используемые в настоящем документе термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела» относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с PD-L1.

**[039]** Предусмотрено, что используемый в настоящем документе термин «выделенное антитело» относится к антителу, которое по сути не включает в себя другие антитела (Ab), характеризующиеся другими антигennыми специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-L1, или его фрагмент, по сути не

включает в себя Ab, которые специфически связываются с антигенами, отличными от PD-L1.

**[040]** Используемый в настоящем документе термин «поверхностный плазмонный резонанс» относится к оптическому явлению, которое позволяет проанализировать биомолекулярные взаимодействия в режиме реального времени путем обнаружения изменений в концентрациях белка в пределах биосенсорной матрицы, например, с использованием системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden и Piscataway, N.J.).

**[041]** Предусмотрено, что используемый в настоящем документе термин « $K_D$ » относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

**[042]** Термин «эпитоп» относится к антигенному детерминанту, которая взаимодействует с конкретным сайтом связывания антигена в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Отдельный антиген может иметь более чем один эпитоп. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут характеризоваться различными биологическими эффектами. Термин «эпитоп» также относится к сайту на антигене, с которым реагируют В- и/или Т-клетки. Он также относится к области антигена, которая связывается антителом. Эпитопы могут быть определены как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, как правило, представляют собой подгруппу структурных эпитопов и содержат такие остатки, которые вносят прямой вклад в аффинность взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, то есть состоящими из нелинейных аминокислот. Согласно определенным вариантам осуществления эпитопы могут включать в себя детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и согласно определенным вариантам осуществления могут характеризоваться конкретными трехмерными структурными характеристиками и/или конкретными характеристиками заряда.

**[043]** Термин «существенная идентичность» или «по сути идентичная», относящийся к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) наблюдается идентичность нуклеотидных последовательностей по меньшей мере у приблизительно 90% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, согласно измерению с помощью любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP.

**[044]**

Применительно к полипептидам термин «существенное сходство» или "по сути сходный" означает, что две пептидных последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие гэпа по умолчанию, обладают по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 95%, 98% или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются на консервативные аминокислотные замены. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, характеризующимся боковой цепью (группой R) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем, консервативная аминокислотная замена не будет по сути изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень сходства можно отрегулировать в сторону повышения для корректировки в отношении консервативной природы замены. Средства для проведения такой корректировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают в себя 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серии и треонин; 3) амидосодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат, и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных аминокислотных замен представляют собой следующие: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативное замещение представляет собой любое изменение, характеризующееся положительным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-45, включенной в настоящий документ посредством ссылки. «Умеренно консервативное» замещение представляет собой любое изменение, характеризующееся неотрицательным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250. Сходство последовательностей для полипептидов, как правило, измеряют с использованием

программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков проверяет соответствие сходных последовательностей с использованием величин сходства, присвоенных различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе консервативным аминокислотным заменам. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутеином. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с использованием FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендуемыми параметрами; программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и идентичность последовательностей в процентах для областей наилучшего перекрывания между последовательностями поискового запроса и поиска (Pearson (2000), выше). Другой предпочтительный алгоритм при сравнении последовательности в соответствии с настоящим раскрытием с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от различных организмов, представляет собой компьютерную программу BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410, и (1997) Nucleic Acid Res. 25:3389-3402, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

**[045]** Под фразой «терапевтически эффективное количество» подразумевают количество, которое производит требуемый эффект, для которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения, и его сможет определить специалист в данной области с использованием известных техник (см., например, Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding).

**[046]** Используемый в настоящем документе термин «субъект» относится к животному, предпочтительно млекопитающему, нуждающемуся в облегчении, профилактике и/или лечении заболевания или нарушения, такого как хроническая вирусная инфекция, злокачественная опухоль или аутоиммунное заболевание.

## **П. Меченные радиоактивной меткой иммуноконьюгаты антител против PD-L1 для иммуно-ПЭТ визуализации**

**[047]** В настоящем документе представлены меченные радиоактивной меткой антигенсвязывающие белки, которые связывают лиганд 1 программируемой смерти

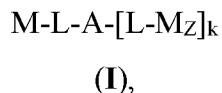
клетки (PD-L1). Согласно некоторым вариантам осуществления меченные радиоактивной меткой антигенсвязывающие белки включают в себя антигенсвязывающий белок, ковалентно соединенный с одним или несколькими хелатирующими фрагментами, которые являются химическими фрагментами, способными хелатировать позитронный излучатель.

**[048]** Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе представлены антигенсвязывающие белки, которые связывают PD-L1, например, антитела, при этом указанные антигенсвязывающие белки, которые связывают PD-L1, ковалентно связаны с одним или несколькими фрагментами, имеющими следующую структуру:



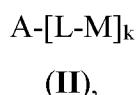
при этом L представляет собой хелатирующий фрагмент; M представляет собой позитронный излучатель; а z независимо в каждом случае равняется 0 или 1; и при этом по меньшей мере один из z равняется 1.

**[049]** Согласно некоторым вариантам осуществления меченный радиоактивной меткой антигенсвязывающий белок представляет собой соединение формулы (I):



при этом A представляет собой белок, который связывает PD-L1; L представляет собой хелатирующий фрагмент; M представляет собой позитронный излучатель; z равняется 0 или 1; и k равняется целому числу от 0 до 30. Согласно некоторым вариантам осуществления k равняется 1.

**[050]** Согласно некоторым вариантам осуществления меченный радиоактивной меткой антигенсвязывающие белок представляет собой соединение формулы (II):



при этом A представляет собой белок, который связывает PD-L1; L представляет собой хелатирующий фрагмент; M представляет собой позитронный излучатель; и k равняется целому числу от 1 до 30.

**[051]** Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе представлены композиции, включающие в себя коньюгат, имеющий следующую структуру:



при этом A представляет собой белок, который связывается PD-L1; L представляет собой хелатирующий фрагмент; и k равняется целому числу от 1 до 30; при этом коньюгат

хелатируется с позитронным излучателем в количестве, достаточном для обеспечения специфической активности, подходящей для клинической ПЭТ визуализации.

**[052]** Подходящие связывающие белки, хелатирующие фрагменты и позитронные излучатели представлены ниже.

#### A. PD-L1 связывающие белки

**[053]** Подходящими связывающими PD-L1 белками являются белки, которые специфически связываются с PD-L1, в том числе описанные в публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, включенной в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Иллюстративные антитела против PD-L1 в соответствии с настоящим раскрытием приведены в таблице 1 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, также представленной ниже.

**Таблица 1. Идентификаторы аминокислотных последовательностей**

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR 3
H2M8306N	2	4	6	8	10	12	14	16
H2M8307N	18	20	22	24	26	28	30	32
H2M8309N	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M8310N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M8312N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M8314N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M8316N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M8317N	114	116	118	120	122	124	126	128
H2M8321N	130	132	134	136	138	140	142	144
H2M8323N	146	148	150	152	154	156	158	160
H2M8718N	162	164	166	168	170	172	174	176
H2M8718N2	178	180	182	184	170	172	174	176
H2M8719N	186	188	190	192	194	196	198	200
H1H9323P	202	204	206	208	210	212	214	216
H1H9327P	218	220	222	224	226	228	230	232
H1H9329P	234	236	238	240	242	244	246	248
H1H9336P	250	252	254	256	258	260	262	264
H1H9344P2	266	268	270	272	274	276	278	280
H1H9345P2	282	284	286	288	274	276	278	280

H1H9351P2	290	292	294	296	274	276	278	280
H1H9354P2	298	300	302	304	274	276	278	280
H1H9364P2	306	308	310	312	274	276	278	280
H1H9373P2	314	316	318	320	274	276	278	280
H1H9382P2	322	324	326	328	274	276	278	280
H1H9387P2	330	332	334	336	274	276	278	280
H1H9396P2	338	340	342	344	274	276	278	280

В таблице 1 излагаются идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR), вариабельных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител против PD-L1.

**[054]** Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1, или по сути схожей с ними последовательности, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

**[055]** Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в таблице 1, или по сути схожей с ними последовательности, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

**[056]** Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), включающую в себя любую из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в таблице 1. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, включающим в себя пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных антител против PD-L1, приведенных в таблице 1. Согласно некоторым вариантам осуществления пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR

выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/170, 186/194, 202/210, 218/226, 234/242, 250/258, 266/274, 282/274, 290/274, 298/274, 306/274, 314/274, 322/274, 330/274 и 338/274.

Согласно некоторым вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из одной из SEQ ID NO: 82/90 (например, H2M8314N), 162/170 (например, H2M8718N), 306/274 (например, H1H9364P2) и 314/274 (например, H1H9373P2). Согласно некоторым другим вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из одной из SEQ ID NO: 98/106 (например, H2M8316N), 146/154 (например, H2M8323N), 290/274 (например, H1H9351P2) и 330/274 (например, H1H9387P2).

**[057]** Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, приведенных в таблице 1 или по сути схожей с ними последовательности, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

**[058]** Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, приведенных в таблице 1 или по сути схожей с ними последовательности, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

**[059]** Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в таблице 1 или по сути схожей с ними последовательности, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

**[060]** Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя CDR1 тяжелой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, приведенных в таблице 1 или по сути

схожей с ними последовательности, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

**[061]** Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя CDR2 тяжелой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, приведенных в таблице 1 или по сути схожей с ними последовательности, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

**[062]** Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя CDR3 тяжелой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в таблице 1 или по сути схожей с ними последовательности, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

**[063]** Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя пару аминокислотных последовательностей HCVR3 и LCVR3 (HCVR3/LCVR3), включающую в себя любую из аминокислотных последовательностей HCVR3, приведенных в таблице 1, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCVR3, приведенных в таблице 1. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, включающим в себя пару аминокислотных последовательностей HCVR3/LCVR3, содержащуюся в любом из иллюстративных антител против PD-L1, приведенных в таблице 1. Согласно некоторым вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 88/96 (например, H2M8314N), 168/176 (например, H2M8718N), 312/280 (например, H1H9364P2), и 320/280 (например, H1H9373P2). Согласно некоторым другим вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 104/112 (например, H2M8316N), 152/160 (например, H2M8323N), 296/280 (например, H1H9351P2) и 336/280 (например, H1H9387P2).

**[064]** Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя набор из шести CDR (т.

e. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в любом из иллюстративных антител против PD-L1, приведенных в таблице 1. Согласно некоторым вариантам осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 84-86-88-92-94-96 (например, H2M8314N); 164-166-168-172-174-176 (например, H2M8718N); 308-310-312-276-278-280 (например, H1H9364P2) и 316-318-320-276-278-280 (например, H1H9373P2). Согласно некоторым другим вариантам осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 100-102-104-108-110-112 (например, H2M8316N); 148-150-152-156-158-160 (например, H2M8323N); 292-294-296-276-278-280 (например, H1H9351P2) и 332-334-336-276-278-280 (например, H1H9387P2).

**[065]** Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя набор из шести CDR (т. е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, определяемой в любом из иллюстративных антитела против PD-L1, приведенных в таблице 1. Например, согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 82/90 (например, H2M8314N), 98/106 (например, H2M8316N), 146/154 (например, H2M8323N), 162/170 (например, H2M8718N), 290/274 (например, H1H9351P2), 306/274 (например, H1H9364P2), 314/274 (например, H1H9373P2) и 330/274 (например, H1H9387P2). Способы и методики для идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в уровне техники и могут быть использованы для идентификации CDR в определенных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрываемых в настоящем документе. Иллюстративные правила, которые могут быть использованы для идентификации границ CDR, включают в себя, например, определение согласно Kabat, определение согласно Chothia и определение согласно AbM. В общих чертах, определение согласно Kabat основано на вариабельности последовательностей, определение согласно Chothia основано на расположении областей структурных петель, а определение согласно AbM является компромиссом между подходами Kabat и Chothia. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); и Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad.*

*Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Также имеются общедоступные базы данных также для идентификации последовательностей CDR в антителе.

**[066]** Согласно некоторым вариантам осуществления связывающими белками являются антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют за специфическое связывание с PD-L1 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, включающим в себя CDR из HCVR и CDR из LCVR, при этом каждая из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, приведенных в таблице 1.

**[067]** Согласно некоторым вариантам осуществления связывающими белками являются выделенные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или его антигенсвязывающий фрагмент, которые блокируют связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1, могут связываться с тем же эпитопом на PD-L1, что и PD-1/B7-1, или могут связываться с другим эпитопом на PD-L1, чем PD-1/B7-1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим раскрытием, которые блокируют связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1, включают в себя CDR из HCVR, имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1; и CDR из LCVR, имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, приведенных в таблице 1.

**[068]** Согласно альтернативным вариантам осуществления связывающими белками являются выделенные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые не блокируют связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего раскрытия относится к выделенным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают PD-L1, при этом антитела или их антигенсвязывающие фрагменты усиливают связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые усиливают связывание PD-L1 с PD-1/B7-1, включают в себя CDR из HCVR, при этом HCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 66, 114, 130, 202, 218, 266, 282, 298, 322 и 338; и CDR из LCVR, при этом LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 74, 122, 138, 210, 226 и 274. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают в себя пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из

SEQ ID NO: 18/26 (например, H2M8307N), 66/74 (например, H2M8312N), 114/122 (например, H2M8317N), 130/138 (например, H2M8321N), 202/210 (например, H1H9323P), 218/226 (например, H1H9327P), 266/274 (например, H1H9344P2), 282/274 (например, H1H9345P2), 298/274 (например, H1H9354P2), 322/274 (например, H1H9382P2) и 338/274 (например, H1H9396P2).

[069] Согласно некоторым вариантам осуществления связывающими белками являются антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PD-L1 от человека или других видов. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела могут связываться с PD-L1 человека и/или PD-L1 яванского макака.

[070] Согласно некоторым вариантам осуществления связывающими белками являются антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые перекрестно конкурируют за связывание с PD-L1 с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, включающим в себя CDR из HCVR и CDR из LCVR, при этом каждая из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, приведенных в таблице 1.

[071] Согласно одному варианту осуществления связывающим белком является выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые обладают одной или несколькими из следующих характеристик: (a) блокируют связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1; (b) специфически связываются с PD-L1 человека и/или PD-L1 яванского макака; (c) ингибируют пролиферацию Т-клеток в анализе на основе реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR) и (d) увеличивают секрецию IL-2 и/или гамма-интерферона в анализе MLR.

[072] Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые могут связываться специфически с PD-L1 агонистическим образом, т. е. они усиливают или стимулируют связывание и/или активность PD-L1; согласно другим вариантам осуществления антитело может связываться специфически с PD-L1 антагонистическим образом, т. е. оно блокирует связывание PD-L1 с его рецептором.

[073] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты являются биспецифическими, включающими в себя первую специфичность связывания с PD-L1 и вторую специфичность связывания для второго целевого эпитопа. Второй целевой эпитоп может представлять собой другой эпитоп на PD-L1 или на другом белке, таком как Т-клеточный соингибитор. Согласно определенным вариантам осуществления целевой эпитоп может находиться на другой клетке, в том числе, например, на другой Т-клетке, В-клетке, опухолевой клетке, клетке аутоиммунной ткани

или инфицированной вирусом клетке.

**[074]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител связывают мономерный PD-L1 (например, при 25°C или при 37°C) с K<sub>D</sub> менее чем приблизительно 318 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, или по сути подобного анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают мономерный PD-L1 с K<sub>D</sub> менее чем приблизительно 300 пМ, менее чем приблизительно 250 пМ, менее чем приблизительно 150 пМ, менее чем приблизительно 100 пМ или менее чем приблизительно 50 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, или по сути подобного анализа.

**[075]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител связывают димерный PD-L1 (например, при 25°C или при 37°C) с K<sub>D</sub> менее чем приблизительно 15 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, или по сути подобного анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают димерный PD-L1 с K<sub>D</sub> менее чем приблизительно 12 пМ, менее чем приблизительно 10 пМ, менее чем приблизительно 8 пМ или менее чем приблизительно 5 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, или по сути подобного анализа.

**[076]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают PD-L1 яванского макака (*Macaca fascicularis*) (например, при 25°C или при 37°C) с K<sub>D</sub> менее чем приблизительно 28 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают PD-L1 яванского макака с K<sub>D</sub> менее чем приблизительно 25 нМ, менее чем приблизительно 20 нМ, менее чем приблизительно 15 нМ, менее чем приблизительно 10 нМ или менее чем приблизительно 5 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата

анализа, определенного в примере 3 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, или по сути подобного анализа.

**[077]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител связывают PD-L1 с диссоциационным периодом полужизни ( $t_{1/2}$ ) более чем приблизительно 1 минута, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, или по сути подобного анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты связывают PD-L1 с  $t_{1/2}$  более чем приблизительно 5 минут, более чем приблизительно 10 минут, более чем приблизительно 30 минут, более чем приблизительно 50 минут, более чем приблизительно 60 минут, более чем приблизительно 70 минут, более чем приблизительно 80 минут, более чем приблизительно 90 минут, более чем приблизительно 100 минут, более чем приблизительно 200 минут, более чем приблизительно 300 минут, более чем приблизительно 400 минут, более чем приблизительно 500 минут, более чем приблизительно 600 минут, более чем приблизительно 700 минут или более чем приблизительно 800 минут, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1 (например, формата захвата mAb или захвата антигена), или по сути подобного анализа.

**[078]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют связывание PD-L1 с PD-1 с IC<sub>50</sub> менее чем приблизительно 770 пМ, как определено с использованием иммуноанализа на основе ELISA, например, как показано в примере 4 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, или по сути подобного анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют связывание PD-L1 с B7-1 с IC<sub>50</sub> менее чем приблизительно 10 нМ как определено с использованием иммуноанализа на основе ELISA, например, как показано в примере 4 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, или по сути подобного анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты связываются с PD-L1 и усиливают связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1.

**[079]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитела связываются с внеклеточным доменом PD-L1 или с фрагментом домена. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела связываются с более чем одним доменом (перекрестно

реакционноспособные антитела). Согласно некоторым вариантам осуществления антитела связываются с эпитопом, расположенным во внеклеточном домене, включающем в себя аминокислотные остатки 19-239 NP\_054862.1.

**[080]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитела функционируют путем блокирования или ингибирования PD-1-связывающей или B7-1-связывающей активности, ассоциированной с PD-L1, путем связывания с любой другой областью или фрагментом полноразмерного белка. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела ослабляют или модулируют взаимодействие между PD-L1 и PD-1/B7-1.

**[081]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитела являются биспецифическими антителами. Биспецифические антитела могут связывать один эпитоп в одном домене и также могут связывать второй эпитоп в другом домене PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления биспецифические антитела связывают два разных эпитопа в одном и том же домене. Согласно одному варианту осуществления мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первую специфичность связывания антигена, при этом первая специфичность связывания содержит внеклеточный домен или его фрагмент PD-1; и вторую специфичность связывания антигена с другим эпитопом PD-L1. Согласно другому варианту осуществления мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первую специфичность связывания антигена, при этом первая специфичность связывания содержит внеклеточный домен или его фрагмент B7-1; и вторую специфичность связывания антигена с другим эпитопом PD-L1.

**[082]** Согласно одному варианту осуществления антитело или его фрагмент является полностью человеческим моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который связывается с PD-L1, при этом антитело или его фрагмент обладает одной или несколькими из следующих характеристик: (i) содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 186, 202, 218, 234, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 306, 314, 322, 330 и 338, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (ii) содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 194, 210, 226, 242, 258 и 274, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (iii) содержит домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88,

104, 120, 136, 152, 168, 184, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 280, 288, 296, 304, 312, 320, 328, 336 и 344, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; и домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 200, 216, 232, 248, 264 и 280, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (iv) содержит домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 292, 300, 308, 316, 324, 332 и 340, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 294, 302, 310, 318, 326, 334 и 342, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 196, 212, 228, 244, 260 и 276, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; и домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 198, 214, 230, 246, 262 и 278, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (v) является мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой, включающей в себя первую специфичность связывания с PD-L1 и вторую специфичность связывания с антигеном, выбранным из группы, состоящей из PD-L1, опухолеспецифического антигена, антигена инфицированной вирусом клетки и Т-клеточного соингибитора; (vi) связывается с PD-L1 человека с  $K_D$  от приблизительно 4 пМ до приблизительно 645 нМ; (vii) связывается с PD-L1 яванского макака с  $K_D$  от приблизительно 70 пМ до приблизительно 400 нМ; (viii) блокирует или усиливает связывание PD-L1 с PD-1 с  $IC_{50} \leq 770$  пМ; (ix) блокирует или усиливает связывание PD-L1

с B7-1 с IC<sub>50</sub> ≤ 10 нМ; (x) блокирует индуцированную PD-1 Т-клеточную отрицательную регуляцию и/или восстанавливает Т-клеточную передачу сигнала в анализе репортерного гена люциферазы в Т-клетках/APC; (xi) стимулирует Т-клеточную пролиферацию и активность в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR); (xii) индуцирует продуцирование IL-2 и/или IFNγ в анализе MLR; и (xiii) подавляет рост опухоли и увеличивает выживаемость у субъектов со злокачественной опухолью.

**[083]** Согласно одному варианту осуществления антитело или его фрагмент является полностью человеческим моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые блокируют связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1, при этом антитело или его фрагмент обладает одной или несколькими из следующих характеристик: (i) содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 82, 98, 146, 162, 290, 306, 314 и 330, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (ii) содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 90, 106, 154, 170 и 274, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (iii) содержит домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 88, 104, 152, 168, 296, 312, 320 и 336, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; и домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 96, 112, 160, 176, и 280, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (iv) содержит домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 84, 100, 148, 164, 292, 308, 316 и 332, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 86, 102, 150, 166, 294, 310, 318 и 334, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей;

домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 92, 108, 156, 172 и 276, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; и домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 94, 110, 158, 174 и 278, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (v) является мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой, включающей в себя первую специфичность связывания с PD-L1 и вторую специфичность связывания с антигеном, выбранным из группы, состоящей из другого эпитопа PD-L1, опухолеспецифического антигена, антигена инфицированной вирусом клетки и Т-клеточного соингибитора; (vi) связывается с PD-L1 человека с  $K_D \leq 10^{-10}$  М; (vii) связывается с PD-L1 яванского макака с  $K_D \leq 10^{-7}$  М; (viii) блокирует индуцированную PD-1 Т-клеточную отрицательную регуляцию и/или восстанавливает Т-клеточную передачу сигнала в анализе репортерного гена люциферазы в Т-клетках/APC; (xi) стимулирует Т-клеточную пролиферацию и активность в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR); (xii) индуцирует продуцирование IL-2 и/или IFN $\gamma$  в анализе MLR; и (xiii) подавляет рост опухоли и увеличивает выживаемость у субъектов со злокачественной опухолью.

**[084]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитела против PD-L1 или их антигенсвязывающие фрагменты связывают эпитоп в пределах любой одной или нескольких из областей, иллюстративно представленных в PD-L1, либо в натуральной форме, либо полученных рекомбинантно, или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим раскрытием связываются с внеклеточной областью, включающей в себя одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков 19-239 PD-L1. Согласно определенным вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим раскрытием связываются с областью, включающей в себя одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков 1-221 PD-L1 яванского макака.

**[085]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим раскрытием, показанные в таблице 1, взаимодействуют по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных остатков, варьирующих от приблизительно положения 19 до

приблизительно положения 130 в PD-L1; или аминокислотных остатков, варьирующих от приблизительно положения 130 до приблизительно положения 153 в PD-L1; или аминокислотных остатков, варьирующих от приблизительно положения 153 до приблизительно положения 210 в PD-L1; или аминокислотных остатков, варьирующих от приблизительно положения 210 до приблизительно положения 239 в PD-L1.

**[086]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитела против PD-L1 связываются с тем же эпитопом или частью эпитопа, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описываемых в настоящем документе в таблице 1, или антитело, имеющее последовательности CDR любого из иллюстративных антител, описываемых в таблице 1. Подобным образом, подходящие антитела также включают в себя антитела против PD-L1, которые конкурируют за связывание с PD-L1 или фрагментом PD-L1 с любым из конкретных иллюстративных антител, описываемых в настоящем документе в таблице 1, или антитело, имеющее последовательности CDR любого из иллюстративных антител, описываемых в таблице 1. Например, подходящие антитела включают в себя антитела против PD-L1, которые перекрестно конкурируют за связывание с PD-L1 с одним или несколькими антителами, определяемыми в примере 6 настоящего документа (например, H2aM8309N, H1H9329P, H1H9336P, H2aM8314N, H2aM8316N, H2AM8718N, H1H9387P2, H1H9351P2, H1H9364P2, H1H9373P2 и H2aM8306N). Настоящее раскрытие также относится к антителам против PD-L1, которые перекрестно конкурируют за связывание с PD-L1 с одним или несколькими антителами, определяемыми в примере 6 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1 (например, H1H9396P2, H2aM8317N, H2aM8321N, H1H9323P, H1H9382P2, H1H9344P2, H1H9345P2 и H1H9354P2).

**[087]** Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описываемые в настоящем документе, специфически связываются с PD-L1 и модулируют взаимодействие PD-L1 с PD-1 или с B7-1. Антитела против PD-L1 могут связываться с PD-L1 с высокой аффинностью или с низкой аффинностью. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела являются блокирующими антителами, при этом антитела связываются с PD-L1 и блокируют взаимодействие PD-L1 с PD-1 или с B7-1. Согласно некоторым вариантам осуществления блокирующие антитела в соответствии с настоящим раскрытием блокируют связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1 и/или стимулируют или усиливают активацию Т-клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления блокирующие антитела применимы для стимуляции или усиления иммунного ответа и/или для лечения субъекта, страдающего от злокачественной опухоли или хронической вирусной инфекции. Антитела при введении субъекту, нуждающемуся в этом, могут уменьшать хроническую

инфекцию, вызванную вирусом, таким как HIV, LCMV или HBV, у субъекта. Они могут быть использованы для ингибиования роста опухолевых клеток у субъекта. Они могут быть использованы отдельно или в качестве вспомогательной терапии с другими терапевтическими фрагментами или методами, известными в уровне техники для лечения злокачественной опухоли или вирусной инфекции. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела против PD-L1, которые связываются с PD-L1 с низкой аффинностью, используют в виде мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, при этом первая специфичность связывания связывается с PD-L1 с низкой аффинностью, а вторая специфичность связывания связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из другого эпитопа в PD-L1, Т-клеточного соингибитора, такого как PD-1, опухолеспецифического антигена и специфического в отношении инфицированной клетки антигена.

**[088]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим раскрытием являются агонистическими антителами, при этом антитела связываются с PD-L1 и усиливают взаимодействие PD-L1 и PD-1/B7-1. Согласно некоторым вариантам осуществления активирующие антитела усиливают связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1 и/или ингибируют или подавляют активацию Т-клеток. Активирующие антитела в соответствии с настоящим раскрытием могут быть применимы для ингибиования иммунного ответа у субъекта и/или для лечения аутоиммунного заболевания.

**[089]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитела против PD-L1 являются мультиспецифическими антигенсвязывающими молекулами, при этом они включают в себя первую специфичность связывания с PD-L1 и вторую специфичность связывания с антигеном, выбранным из группы, состоящей из другого эпитопа PD-L1, Т-клеточного соингибитора, такого как PD-1, опухолеспецифического антигена и специфического для инфицированной клетки антигена. Согласно некоторым вариантам осуществления первая специфичность связывания связывается с PD-L1 с низкой аффинностью, например, с  $K_D$   $10^{-8}$  М,  $10^{-7}$  М или больше.

**[090]** Некоторые антитела против PD-L1 в соответствии с настоящим раскрытием способны связываться с PD-L1 и нейтрализовать его активность, как определено с помощью *in vitro* или *in vivo* анализов. Способность антител в соответствии с настоящим раскрытием связываться с PD-L1 и нейтрализовать его активность, может быть измерена с использованием любого стандартного способа, известного специалистам в данной области, включающего в себя анализы связывания или анализы активности, описываемые в настоящем документе.

**[091]** Неограничивающие иллюстративные *in vitro* анализы для измерения связывающей активности иллюстрируются в примере 3 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1. В примере 3 аффинности связывания и кинетические константы человеческого антитела против PD-L1 в отношении PD-L1 человека и PD-L1 яванского макака определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса и измерения выполняли на аппарате T200 Biacore. В примерах 4 и 5 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1 анализы блокирования использовали для определения способности антитела против PD-L1 блокировать PD-L1-связывающую способность с PD-1 или с B7-1 *in vitro*. В примере 6 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1 анализы блокирования использовали для определения перекрестной конкуренции между различными антителами против PD-L1. В примере 7 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1 описывается связывание антител с клетками, надэкспрессирующими PD-L1. В примере 8 патентного документа США № US 2015-0203580 A1 использовали люциферазный анализ для определения способности антител против PD-L1 антагонизировать передачу сигнала PD-1/PD-L1 в Т-клетках.

**[092]** Если определено не указано иное, используемый в настоящем документе термин «антитело» следует понимать как включающий в себя молекулы антител, содержащие две тяжелых цепи иммуноглобулина и две легких цепи иммуноглобулина (т. е. «полные молекулы антитела»), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Используемые в настоящем документе термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и подобные включают в себя любой встречающийся в природе, получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Используемые в настоящем документе термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела» относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с PD-L1. Фрагмент антитела может включать в себя фрагмент Fab, фрагмент F(ab')2, фрагмент Fv, фрагмент dAb, фрагмент, содержащий CDR, или выделенную CDR. Согласно определенным вариантам осуществления термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к полипептиду или его фрагменту мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы. Согласно таким вариантам осуществления термин «антигенсвязывающий фрагмент» включает в себя, например, внеклеточный домен PD-1, который специфически связывается с PD-L1. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получить, например, из полных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как обработка протеолитическими ферментами

или рекомбинантные методики генной инженерии, включающие в себя манипуляцию и экспрессию ДНК, кодирующую вариабельные и (необязательно) константные домены антитела. Такая ДНК является известной и/или легко доступной, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (в том числе, например, библиотеки фагов-антител), или ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и провести с ней химические манипуляции или использовать методики молекулярной биологии, например, для расположения одного или нескольких вариабельных и/или константных доменов в подходящей конфигурации, или для введения кодонов, создания цистeinовых остатков, модификации, добавления или делеции аминокислот и т. д.

**[093]** Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя следующее: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')<sub>2</sub>; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), такая как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т. д.), иммунофармацевтическое средство на основе модульного белка малого размера (SMIP) и вариабельные домены IgNAR акулы, также предусмотрены в пределах используемого в настоящем документе выражения «антигенсвязывающий фрагмент».

**[094]** Антигенсвязывающий фрагмент антитела будет, как правило, содержать по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может характеризоваться любым размером или аминокислотным составом и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая является смежной или находится в одной рамке считывания с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, характеризующихся доменом V<sub>H</sub>, связанным с доменом V<sub>L</sub>, домены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут быть расположены друг относительно друга в любом подходящем расположении. Например, вариабельная область может являться димерной и содержать димеры V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>, V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> или V<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>. В качестве альтернативы, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub>.

**[095]** Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие

илюстративные конфигурации вариабельных и константных доменов, которые можно обнаружить в пределах антигенсвязывающего фрагмента антитела в соответствии с настоящим раскрытием, включают в себя: (i) V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>; (ii) V<sub>H</sub>-C<sub>H2</sub>; (iii) V<sub>H</sub>-C<sub>H3</sub>; (iv) V<sub>H</sub>-C<sub>H1-C<sub>H2</sub></sub>; (v) V<sub>H</sub>-C<sub>H1-C<sub>H2-C<sub>H3</sub></sub></sub>; (vi) V<sub>H</sub>-C<sub>H2-C<sub>H3</sub></sub>; (vii) V<sub>H</sub>-C<sub>L</sub>; (viii) V<sub>L</sub>-C<sub>H1</sub>; (ix) V<sub>L</sub>-C<sub>H2</sub>; (x) V<sub>L</sub>-C<sub>H3</sub>; (xi) V<sub>L</sub>-C<sub>H1-C<sub>H2</sub></sub>; (xii) V<sub>L</sub>.C<sub>H1-C<sub>H2-C<sub>H3</sub></sub></sub>; (xiii) V<sub>L</sub>-C<sub>H2-C<sub>H3</sub></sub> и (xiv) V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>. В любой конфигурации вариабельных и константных доменов, в том числе в любой из перечисленных выше иллюстративных конфигураций, вариабельные и константные домены могут быть либо напрямую соединены друг с другом, либо могут быть соединены с помощью полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, которые дают в результате гибкое или полугибкое соединение между смежными вариабельным и/или константным доменами в одной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела в соответствии с настоящим раскрытием может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций вариабельных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентном соединении друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> (например, с помощью дисульфидной(ых) связи(ей)).

**[096]** Аналогично полным молекулам антител антигенсвязывающие фрагменты могут являться моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела будет, как правило, содержать по меньшей мере два различных вариабельных домена, при этом каждый вариабельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с различным эпитопом на одном и том же антигене. Любой мультиспецифический формат антител, в том числе иллюстративные биспецифические форматы антител, раскрываемые в настоящем документе, может быть адаптирован для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела в соответствии с настоящим раскрытием с использованием рутинных методик, доступных в уровне техники.

**[097]** Антитела против PD-L1 и фрагменты антител в соответствии с настоящим раскрытием включают в себя белки, характеризующиеся аминокислотными последовательностями, которые отличаются от таковых в описанных антителах, но которые сохраняют способность связываться с PD-L1. Такие вариантные антитела и фрагменты антител содержат одну или несколько вставок, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая является по сути эквивалентной биологической

активности описанных антител. Подобным образом, кодирующие антитело последовательности ДНК в соответствии с настоящим раскрытием включают в себя последовательности, которые содержат одну или несколько вставок, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, являющиеся по сути биоэквивалентом антителу или фрагменту антитела в соответствии с настоящим раскрытием.

**[098]** Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, чья скорость и степень абсорбции не демонстрирует значительного различия при введении в одной и той же молярной дозе при сходных экспериментальных условиях, или в однократной дозе, или в многократных дозах. Некоторые антитела будут рассматриваться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они являются эквивалентными по степени своей абсорбции, но не по своей скорости абсорбции, и все еще могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены на этикетке, не являются значимыми для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при хроническом применении, и считаются несущественными с медицинской точки зрения для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

**[099]** Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если отсутствует клинически значимые различия в их безопасности, чистоте или эффективности.

**[0100]** Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если больной может переключиться один или несколько раз с эталонного продукта на биологический продукт без прогнозируемого увеличения риска неблагоприятных эффектов, включающих в себя клинически значимое изменение иммуногенности или пониженную эффективность, по сравнению с непрерывной терапией без такого переключения.

**[0101]** Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют посредством общего механизма или механизмов действия для состояний или условий применения, в той степени, в которой такие механизмы известны.

**[0102]** Биоэквивалентность можно продемонстрировать с помощью *in vivo* и/или *in vitro* способов. Параметры биоэквивалентности включают в себя, например, (а) *in vivo* тестирование на людях или других млекопитающих, при котором концентрацию антитела

или его метаболитов измеряют в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функцию от времени; (b) *in vitro* тестирование, которое соотнесли с *in vivo* данными биодоступности в отношении человека и которое является достаточно прогностическим в отношении этих данных; (c) *in vivo* тестирование на людях или других млекопитающих, при котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его цели) измеряют как функцию от времени; и (d) в хорошо контролируемом клиническом испытании, которое устанавливает безопасность, эффективность, или биодоступность, или биоэквивалентность антитела.

**[0103]** Биоэквивалентные варианты антител в соответствии с настоящим раскрытием можно сконструировать, например, путем создания различных замен остатков или последовательностей или делеции концевых или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся необходимыми для биологической активности, можно удалить или заменить другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или неправильных межмолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать в себя варианты антител, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

**[0104]** Согласно определенным вариантам осуществления настоящего раскрытия антитела против PD-L1 включают в себя домен Fc, содержащий одну или несколько мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислотной pH по сравнению с нейтральной pH. Например, настоящее раскрытие относится к антителам против PD-L1, содержащим мутацию в области C<sub>H</sub>2 или C<sub>H</sub>3 домена Fc, при этом мутация(и) увеличивает(ют) аффинность домена Fc по отношению к FcRn в кислом окружении (например, в эндосоме, где pH находится в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают в себя, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. Согласно одному варианту осуществления модификация

включает в себя модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259 I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); а также модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). Согласно еще одному варианту осуществления модификация включает в себя модификацию 265A (например, D265A) и/или 297A (например, N297A).

**[0105]** Например, настоящее раскрытие относится к антителам против PD-L1, включающим в себя домен Fc, содержащий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A); а также 433K и 434F (например, H433K и N434F). Согласно одному варианту осуществления настоящего раскрытия относится к антителам против PD-L1, включающим в себя домен Fc, содержащий мутацию S108P в шарнирной области IgG4 для стимуляции стабилизации димера. Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций домена Fc и другие мутации в пределах вариабельных доменов антител, раскрываемых в настоящем документе, предусмотрены в объеме настоящего раскрытия.

**[0106]** Настоящее раскрытие также относится к антителам против PD-L1, включающим в себя химерную константную ( $C_h$ ) область тяжелой цепи, при этом химерная область  $C_h$  содержит сегменты, происходящие из областей  $C_h$  более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела в соответствии с настоящим раскрытием могут содержать химерную область  $C_h$ , содержащую часть или весь домен  $C_{h2}$ , происходящий из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, комбинированную с частью или всем доменом  $C_{h3}$ , происходящим из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Согласно определенным вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим раскрытием содержат химерную область  $C_h$ , характеризующуюся химерной шарнирной областью. Например, химерный шарнир может содержать «верхнюю шарнирную» аминокислотную последовательность (аминокислотные остатки от положения 216 до положения 227 согласно нумерации EU), происходящую из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, комбинированную с «нижней шарнирной» последовательностью (аминокислотные остатки от положения 228 до положения 236 согласно нумерации EU), происходящую из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Согласно

определенным вариантам осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, происходящие из верхнего шарнира IgG1 человека или IgG4 человека, и аминокислотные остатки, происходящие из нижнего шарнира IgG2 человека. Антитело, содержащее химерную область Сн, описанную в настоящем документе, может согласно определенным вариантам осуществления проявлять модифицированные эффекторные функции Fc, не оказывая неблагоприятного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, USSN. 14/170166, поданную 31 января 2014 г., полное раскрытие которой тем самым включено в настоящий документ посредством ссылки).

## **В. Позитронные излучатели и хелатирующие фрагменты**

**[0107]** Подходящие позитронные излучатели включают в себя без ограничения такие, которые образуют стабильные комплексы с хелатирующим фрагментом и характеризуются физическими периодами полужизни, подходящими для целей иммуно-ПЭТ визуализации. Иллюстративные позитронные излучатели включают в себя без ограничения  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{44}\text{Sc}$  и  $^{86}\text{Y}$ . Подходящие позитронные излучатели также включают в себя такие, которые непосредственно связываются со связывающим PD-L1 белком, в том числе без ограничения  $^{76}\text{Br}$  и  $^{124}\text{I}$ , и такие, которые вводятся через простетическую группу, например,  $^{18}\text{F}$ ,

**[0108]** Хелатирующие фрагменты, описываемые в настоящем документе, представляют собой химические фрагменты, которые ковалентно соединены со связывающим PD-L1 белком, например, антителом против PD-L1, и включают в себя часть, способную хелатировать позитронный излучатель, т. е. способную реагировать с позитронным излучателем с образованием координированного хелатного комплекса. Подходящие фрагменты включают в себя такие, которые обеспечивают эффективную загрузку конкретного металла и образуют комплексы металл-хелатор, которые являются достаточно стабильными *in vivo* для диагностических применений, например, для иммуно-ПЭТ визуализации. Иллюстративные хелатирующие фрагменты включают в себя такие, которые минимизируют диссоциацию позитронного излучателя и накопление в отложении минералов в кости, белках плазмы и/или костном мозге до степени, подходящей для диагностических применений.

**[0109]** Примеры хелатирующих фрагментов включают в себя без ограничения такие, которые образуют стабильные комплексы с позитронными излучателями  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{44}\text{Sc}$  и/или  $^{86}\text{Y}$ . Иллюстративные хелатирующие фрагменты включают в себя без ограничения те, которые описаны в *Nature Protocols*, 5(4): 739, 2010; *Bioconjugate Chem.*,

26(12): 2579 (2015); *Chem Commun (Camb)*, 51(12): 2301 (2015); *Mol. Pharmaceutics*, 12: 2142 (2015); *Mol. Imaging Biol.*, 18: 344 (2015); *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 37:250 (2010); *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* (2016). doi:10.1007/s00259-016-3499-x; *Bioconjugate Chem.*, 26(12): 2579 (2015); в международной заявке № WO 2015/140212A1 и патенте США № US 5639879, включенных посредством ссылки во всей своей полноте.

**[0110]** Иллюстративные хелатирующие фрагменты также включают в себя без ограничения такие, которые включают в себя дезферриоксамин (DFO), 1,4,7,10-тетрауксусную кислоту (DOTA), диэтилентриаминпентауксусную кислоту (DTPA), этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), (1,4,7,10-тетраазациклогодекан-1,4,7,10-тетра(метиленфосфиновую) кислоту (DOTP), 1R,4R,7R,10R)- $\alpha'\alpha''\alpha'''$ -тетраметил-1,4,7,10-тетраазациклогодекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту (DOTMA), 1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрауксусную кислоту (TETA), H<sub>4</sub>остара, H<sub>6</sub>phospа, H<sub>2</sub>dedpa, H<sub>5</sub>decapa, H<sub>2</sub>azapa, HOPO, DO2A, 1,4,7,10-тетракис(карбамоилметил)-1,4,7,10-тетраазациклогодекан (DOTAM), 1,4,7-триазациклононан-N,N',N"-триуксусную кислоту (NOTA), 1,4,7,10-тетракис(карбамоилметил)-1,4,7,10-тетраазациклогодекан (DOTAM), 1,4,8,11-тетраазабицикло[6,6,2]гексадекан-4,11-уксусную кислоту (CB-TE2A), 1,4,7,10-тетраазациклогодекан (циклен), 1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан (циклам), октадентатные хелаторы, гексадентатные хелаторы, хелаторы на основе фосфонатов, макроциклические хелаторы, хелаторы, включающие в себя макроциклические терефтalamидные лиганды, бифункциональные хелаторы, хелаторы на основе фузаринина С и производных фузаринина С, триацетилфузаринин С (TAFC), ферриоксамин Е (FOXE), ферриоксамин В (FOXB), феррихром А (FCHA) и т. п.

**[0111]** Согласно некоторым вариантам осуществления хелатирующие фрагменты ковалентно связаны со связывающим PD-L1 белком, например, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, через линкерный фрагмент, который ковалентно присоединяет хелатирующую часть хелатирующего фрагмента к связывающему белку. Согласно некоторым вариантам осуществления эти линкерные фрагменты образуются при реакции между реакционноспособным фрагментом связывающего PD-L1 белка, например, цистeinом или лизином антитела, и реакционноспособным фрагментом, который присоединяется к хелатору, включающему в себя, например, п-изотиоцианатобензильную группу и реакционноспособные фрагменты, представленные в способах конъюгации ниже. Кроме того, такие линкерные фрагменты необязательно включают в себя химические группы, используемые для целей регулирования полярности, растворимости, стерических взаимодействий, жесткости и/или длины между хелатирующей частью и связывающим PD-L1 белком.

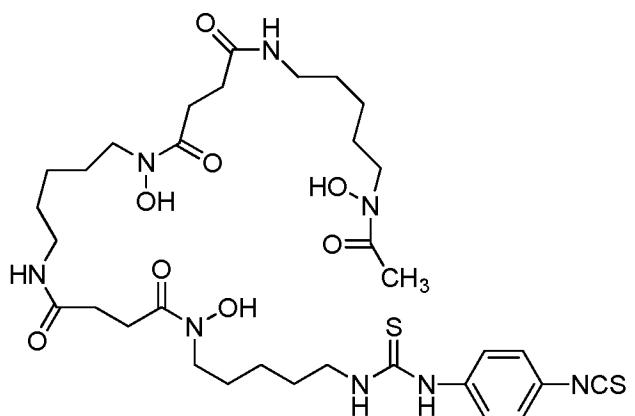
### C. Получение меченых радиоактивной меткой конъюгатов антитела против PD-L1

**[0112]** Меченные радиоактивной меткой конъюгаты антитела против PD-L1 могут быть получены путем (1) осуществления реагирования связывающего PD-L1 белка, например, антитела, с молекулой, включающей в себя хелатор для позитронного излучателя и фрагмент, реакционноспособный в отношении желаемого сайта конъюгации связывающего PD-L1 белка, и (2) загрузки желаемого позитронного излучателя.

**[0113]** Подходящие сайты конъюгации включают в себя без ограничения лизин и цистеин, оба из которых могут быть, например, нативными или сконструированными, и могут, например, присутствовать в тяжелой или легкой цепи антитела. Сайты конъюгации цистеина включают в себя без ограничения полученные путем мутации, вставки или восстановления дисульфидных связей антитела. Способы получения сконструированных с цистеином антител включают в себя без ограничения описанные в международной заявке № WO 2011/056983. Способы сайтспецифической конъюгации также могут быть использованы для направления реакции конъюгации на специфические сайты антитела, достижения желаемой стехиометрии и/или достижения желаемых отношений лекарственного средства к антителу (DAR). такие способы конъюгации известны специалистам в данной области и включают в себя без ограничения способ цистеинового конструирования, ферментативный и хемоферментативный способы, предусматривающие без ограничения конъюгацию глутамина, конъюгацию Q295 и опосредованную трансглутаминазой конъюгацию, а также те, которые описаны в *J. Clin. Immunol.*, 36: 100 (2016), включенной в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Подходящие фрагменты, реакционноспособные в отношении желаемого сайта конъюгации, обычно обеспечивают эффективное и легкое связывание связывающего PD-L1 белка, например, антитела и хелатора для позитронного излучателя. Фрагменты, реакционноспособные в отношении лизиновых и цистеиновых сайтов, включают в себя электрофильные группы, которые известны специалистам в данной области. Согласно некоторым аспектам, когда желаемым сайтом конъюгации является лизин, реакционноспособный фрагмент представляет собой изотиоцианат, например, п-изотиоцианатобензильную группу или реакционноспособный сложный эфир. Согласно некоторым аспектам, когда желаемым сайтом конъюгации является цистеин, реакционноспособный фрагмент представляет собой малеимид.

**[0114]** Когда хелатор представляет собой дезферриоксамин (DFO), подходящие реакционноспособные фрагменты включают в себя без ограничения

изотиоцианатобензильную группы, н-гидроксисукцинимидный сложный эфир, 2,3,5,6-тетрафторфенольный сложный эфир, н-сукцинимидил-*S*-ацетилтиоацетат и такие, которые описаны в *BioMed Research International*, Vol 2014, Article ID 203601, включенной в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим PD-L1 белком является антитело, а молекула, включающая в себя хелатор для позитронного излучателя и фрагмент, реакционноспособный в отношении сайта конъюгации, представляет собой п-изотиоцианатобензил-дезферриоксамин (p-SCN-Bn-DFO):



[0115] Загрузку позитронного излучателя осуществляют путем инкубации конъюгата связывающего PD-L1 белка и хелатора с позитронным излучателем в течение времени, достаточного для обеспечения координации указанного позитронного излучателя с хелатором, например, путем осуществления способов, описанных в представленных в настоящем документе примерах, или по сути подобного способа.

#### D. Иллюстративные варианты осуществления конъюгатов

[0116] В настоящем раскрытии представлены меченные радиоактивной меткой конъюгаты антитела, включающие в себя антитело или его антигенсвязывающие фрагмент, которые связывают человеческий лиганд 1 программируемой смерти клетки (PD-L1), хелатирующий фрагмент и позитронный излучатель.

[0117] Согласно некоторым вариантам осуществления хелатирующий фрагмент содержит хелатор, способное формировать комплекс с  $^{89}\text{Zr}$ . Согласно некоторым вариантам осуществления хелатирующий фрагмент содержит дезферриоксамин. Согласно некоторым вариантам осуществления хелатирующий фрагмент представляет собой п-изотиоцианатобензил-дезферриоксамин.

[0118] Согласно некоторым вариантам осуществления позитронный излучатель представляет собой  $^{89}\text{Zr}$ .

[0119] Согласно некоторым вариантам осуществления отношение хелатирующего

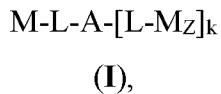
фрагмента к антителу в конъюгате составляет от 1 до 2.

**[0120]** Согласно конкретному варианту осуществления хелатирующий фрагмент представляет собой п-изотиоцианатобензил-дезферриоксамин, а позитронный излучатель представляет собой  $^{89}\text{Zr}$ . Согласно другому конкретному варианту осуществления хелатирующий фрагмент представляет собой п-изотиоцианатобензил-дезферриоксамин, позитронный излучатель представляет собой  $^{89}\text{Zr}$ , а отношение хелатирующего фрагмента к антителу в конъюгате составляет от 1 до 2.

**[0121]** Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе представлены антигенсвязывающие белки, которые связывают PD-L1, при этом указанных антигенсвязывающие белки, которые связывают PD-L1, ковалентно связаны с одним или несколькими фрагментами, имеющими следующую структуру:

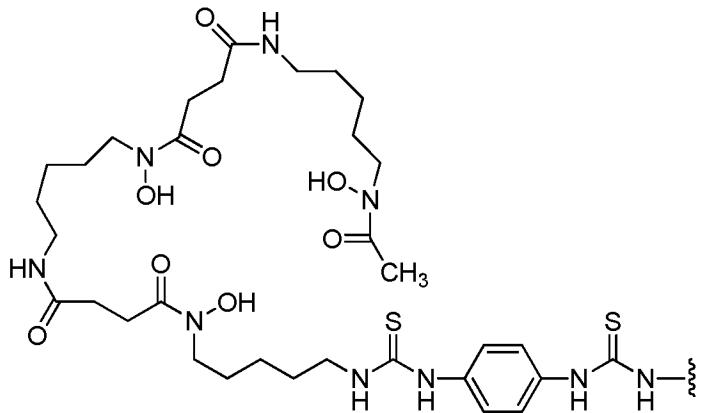


при этом L представляет собой хелатирующий фрагмент; M представляет собой позитронный излучатель; а z независимо в каждом случае равняется 0 или 1; и при этом по меньшей мере один из z равняется 1. Согласно некоторым вариантам осуществления меченный радиоактивной меткой антигенсвязывающий белок представляет собой соединение формулы (I):



при этом A представляет собой белок, который связывает PD-L1; L представляет собой хелатирующий фрагмент; M представляет собой позитронный излучатель; z равняется 0 или 1; и k равняется целому числу от 0 до 30. Согласно некоторым вариантам осуществления k равняется 1.

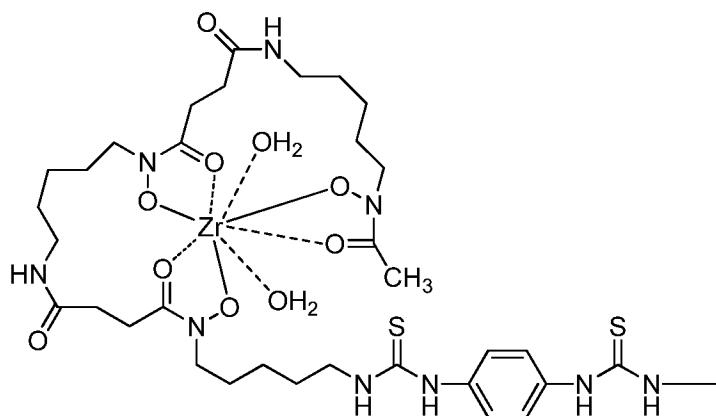
**[0122]** Согласно некоторым вариантам осуществления L представляет собой



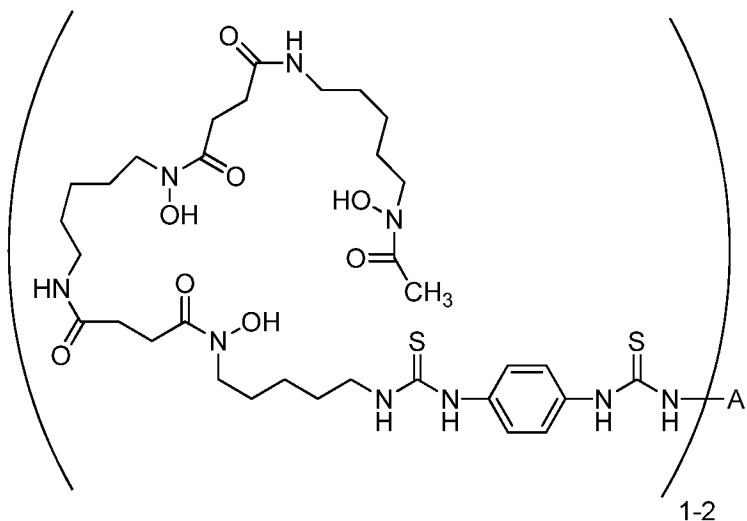
**[0123]** Согласно некоторым вариантам осуществления M представляет собой  $^{89}\text{Zr}$ .

**[0124]** Согласно некоторым вариантам осуществления k равняется целому числу от 1 до 2. Согласно некоторым вариантам осуществления k равняется 1.

[0125] Согласно некоторым вариантам осуществления -L-M представляет собой



[0126] В настоящем раскрытии также представлены способы синтеза меченых радиоактивной меткой конъюгатов антитела, предусматривающие введение в контакт соединения формулы (III):

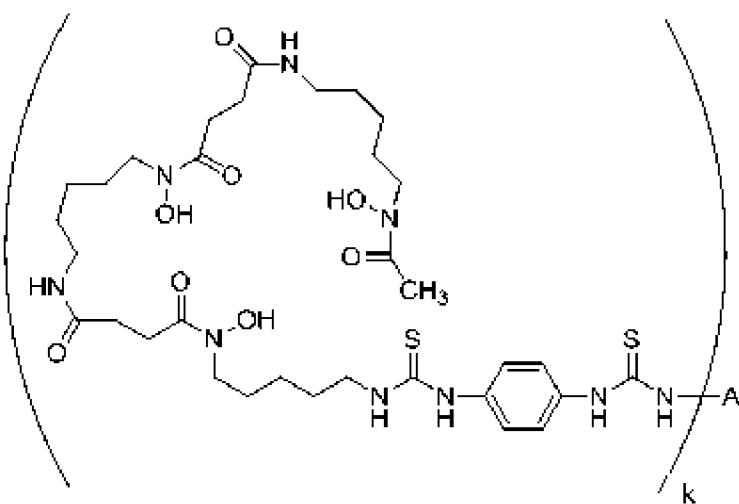


(III),

с  $^{89}\text{Zr}$ , при этом А представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение формулы (III) синтезируют путем введения в контакт антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывающего PD-L1, с p-SCN-Bn-DFO.

[0127] Также в настоящем документе представлен продукт реакции между соединением формулы (III) и  $^{89}\text{Zr}$ .

[0128] В настоящем документе представлены соединения формулы (III):



, при этом А представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают PD-L1, и k равняется целому числу от 0 до 30. Согласно некоторым вариантам осуществления k равняется 1 или 2.

**[0129]** Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе представлены композиции, включающие в себя конъюгат, имеющий следующую структуру:



при этом А представляет собой белок, который связывает PD-L1; L представляет собой хелатирующий фрагмент; и k равняется целому числу от 0 до 30; при этом конъюгат хелатируется с позитронным излучателем в количестве, достаточном для обеспечения специфической активности, подходящей для клинической ПЭТ визуализации. Согласно некоторым вариантам осуществления количество хелатированного позитронного излучателя представляет собой количество, достаточное для обеспечения специфической активности 1-3 мКи на 1-50 мг белка, который связывает PD-L1.

**[0130]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают мономерный человеческий лиганд 1 программируемой смерти клетки (PD-L1) с равновесной константой диссоциации связывания ( $K_D$ ) менее чем приблизительно 310 пМ, как измерено в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C.

**[0131]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают мономерный PD-L1 человека с  $K_D$  менее чем приблизительно 180 пМ в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.

**[0132]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают димерный PD-L1 человека с  $K_D$  менее чем

приблизительно 15 пМ, как измерено в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C.

**[0133]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают димерный PD-L1 человека с K<sub>D</sub> менее чем приблизительно 8 пМ в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.

**[0134]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с PD-L1 человека с эталонным антителом, включающим в себя определяющие комплементарность области (CDR) HCVR, при этом HCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1; и CDR LCVR, при этом LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, приведенных в таблице 1. Согласно некоторым вариантам осуществления эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, приведенных в таблице 1. Согласно некоторым вариантам осуществления эталонное антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 82/90, 98/106, 146/154, 162/170, 290/274, 306/274, 314/274 и 330/274.

**[0135]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливает связывание PD-L1 с одним из PD-1 или B7-1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание PD-L1 с PD-1 и/или B7-1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не увеличивает или не уменьшает связывание PD-L1 с его лигандами.

**[0136]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющие комплементарность области (CDR) HCVR, при этом HCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 66, 114, 130, 202, 218, 266, 282, 298, 322 и 338; и CDR LCVR, при этом LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 74, 122, 138, 210, 226 и 274. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенное антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26, 66/74, 114/122, 130/138, 202/210, 218/226, 266/274, 282/274, 298/274, 322/274 и 338/274.

[0137] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-L1 человека, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1.

[0138] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-L1 человека, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, приведенных в таблице 1.

[0139] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-L1 человека, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит (а) HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1; и (б) LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, приведенных в таблице 1.

[0140] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющих комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), приведенных в таблице 1; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей вариабельной области легкой цепи (LCVR), приведенных в таблице 1.

[0141] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(а) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 292, 300, 308, 316, 324, 332 и 340;

(б) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 294, 302, 310, 318, 326, 334 и 342;

(c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 296, 304, 312, 320, 328, 336 и 344;

(d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 196, 212, 228, 244, 260 и 276;

(e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 198, 214, 230, 246, 262 и 278; и

(f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 200, 216, 232, 248, 264 и 280.

**[0142]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 82/90, 98/106, 146/154, 162/170, 290/274, 306/274, 314/274 и 330/274

**[0143]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR HCVR, при этом HCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 34, 50, 82, 98, 146, 162, 178, 186, 234, 250, 290, 306, 314 и 330; и CDR LCVR, при этом LCVR, имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 42, 58, 90, 106, 154, 170, 194, 242, 258 и 274.

#### **E. Крупномасштабное производство для получения конъюгатов антитела против PD-L1-хелатор**

**[0144]** Настоящее раскрытие относится к процессам крупномасштабного производства для получения антител против PD-L1, конъюгированных с хелатором. Конъюгаты антитело против PD-L1-хелатор имеют форму, подходящую для мечения радиоактивной меткой.

**[0145]** Надлежащие процессы производства соблюдаются в отношении всех аспектов получения, в том числе поддержание стерильной среды, применение асептических процедур, ведение учета всех процессов и документирование качества, чистоты, прочности и идентичности продукта, а также любых отклонений от них.

**[0146]** Процесс крупномасштабного производства согласно некоторым вариантам осуществления протекает на много быстрее, чем процесс производства при исследовании

и разработке. Согласно некоторым вариантам осуществления процесс крупномасштабного производства может занимать менее чем 12 часов, или менее чем 10 часов, или менее чем 8 часов, или менее чем 6 часов, или менее чем 4 часа, или менее чем, или приблизительно 2 часа.

**[0147]** Согласно некоторым вариантам осуществления первая стадия предусматривает ультрафильтрацию и диафильтрацию (UFDF) с использованием мембранные 30-50 кДа антитела против PD-L1 для удаления вспомогательных средств, препятствующих конъюгации веществ и солей, которые ингибируют процесс конъюгации. Иллюстративные мембранные полимеры включают в себя полиэфирсульфон (PES), ацетат целлюлозы (CA) и регенерированную целлюлозу (RC). На данной стадии в растворе антитела заменяют буфер на невзаимодействующий буферный раствор с низкой ионной силой. pH буфера может составлять от приблизительно 4,5 до приблизительно 6, или от приблизительно 5 до приблизительно 6, или от приблизительно 5,3 до приблизительно 5,7, или приблизительно 5,5. Буферные системы, рассматриваемые как применимые в настоящем документе, включают в себя любую буферную систему, в которой отсутствует первичный амин. Иллюстративные буфера включают в себя ацетатные, фосфатные или цитратные буфера. Буфер обеспечивает стабильность белка во время обработки перед конъюгацией. Обрабатываемый объем может быть дополнительно уменьшен для концентрации антитела, затем стерильно отфильтрован.

**[0148]** После предварительной конъюгации с UFDF концентрированное и фильтрованное антитело может быть перенесено в не содержащую амин карбонатную буферную систему. Карбонатная буферная система может иметь pH в диапазоне от приблизительно 8,5 до приблизительно 9,6, или от приблизительно 9,0 до приблизительно 9,6, или от приблизительно 9,2 до приблизительно 9,4, или от приблизительно 9,4 до приблизительно 9,6, или pH приблизительно 9,4.

**[0149]** Добавляют хелатор, например, DFO, в растворитель до целевой концентрации в буферную систему, содержащую антитело, и дополнительный растворитель может быть добавлен в раствор до желаемого процентного содержания. Хелатор может быть добавлен при молярном избытке относительно антитела, например, 3,5-5:1 хелатора к антителу. Суммарный реакционный объем может составлять до 5 л.

**[0150]** Температура реакции и время реакции находятся в обратной зависимости. Например, если температура реакции выше, то время реакции меньше. Если температура реакции ниже, то время реакции выше. В качестве иллюстрации, при температуре выше приблизительно 18°C реакция может занимать менее 2 часов; при температуре ниже 18°C реакция может занять более 2 часов.

**[0151]** Реакция конъюгации может быть прекращена путем гашения, например, путем добавления уксусной кислоты.

**[0152]** Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгацию антитела с дефероксамином проводят для получения конъюгатов DFO-mAb. Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгацию антитела с p-SCN-Bn-дефероксамином проводят для получения конъюгатов DFO-mAb.

**[0153]** Иллюстративные растворители для хелатора включают в себя DMSO и DMA. В последующих стадиях UFDF используют мембранны, и мембранны выбирают на основе системы растворителей, используемой на стадии конъюгации. Например, DMA растворяет PES мембранны, поэтому их нельзя использовать в одной системе.

**[0154]** Карбонатные буферы не являются предпочтительными для стабильности конъюгата при длительном хранении. Таким образом, после образования конъюгатов антитело-хелатор они могут быть заменены на буфер, выбранный специально для длительного хранения и стабильности. Иллюстративные буферы включают в себя цитратный, ацетатный, фосфатный, аргининовый и гистидиновый буферы. Дополнительная стадия UFDF может быть выполнена для удаления остаточных солей и для обеспечения подходящей концентрации, уровня вспомогательного средства и pH конъюгированного моноклонального антитела. Полученные конъюгаты антитело-хелатор можно стерильно фильтровать и хранить для последующего составления.

### **III. Способы использования меченых радиоактивной меткой иммуноконъюгатов**

**[0155]** Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к диагностическим и терапевтическим способам применения меченых радиоактивной меткой конъюгатов антитела в соответствии с настоящим раскрытием.

**[0156]** Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам выявления PD-L1 в ткани, при этом способы предусматривают введение меченого радиоактивной меткой конъюгата антитела, представленного в настоящем документе, в ткань и визуализацию экспрессии PD-L1 с помощью визуализации позитронной эмиссионной томографией (ПЭТ). Согласно некоторым вариантам осуществления ткань содержит клетки или клеточные линии. Согласно некоторым вариантам осуществления ткань присутствует в субъекте, при этом субъектом является млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является субъект-человек. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет заболевание или нарушение, выбранное из группы, состоящей из злокачественной опухоли, инфекционного

заболевания и воспалительного заболевания. Согласно одному варианту осуществления субъект имеет злокачественную опухоль. Согласно некоторым вариантам осуществления инфекционным заболеванием является бактериальная или вирусная инфекция, вызванная, например, вирусом гепатита В (HBV), вирусом гепатита С (HCV), вирусом иммунодефицита человека (HIV) и *Mycobacterium tuberculosis*.

**[0157]** Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам визуализации ткани, которая экспрессирует PD-L1, предусматривающим введение меченого радиоактивной меткой коньюгата антитела в соответствии с настоящим раскрытием в ткань и визуализацию экспрессии PD-L1 с помощью визуализации позитронной эмиссионной томографией (ПЭТ). Согласно одному варианту осуществления ткань содержится в опухоли. Согласно одному варианту осуществления ткань содержится в культуре опухолевых клеток или линии опухолевых клеток. Согласно одному варианту осуществления ткань содержится в опухолевом поражении у субъекта.

**[0158]** Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам измерения ответа на терапию, при этом ответ на терапия измеряют путем измерения воспаления. Способы согласно данному аспекту предусматривают введение меченого радиоактивной меткой коньюгата антитела, представленного в настоящем документе, субъекту, нуждающемуся в этом, и визуализацию экспрессии PD-L1 с помощью визуализации позитронной эмиссионной томографией (ПЭТ). Согласно некоторым вариантам осуществления воспаление присутствует в опухоли у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления усиление экспрессии PD-L1 коррелирует с усилением воспаления в опухоли.

**[0159]** Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам определения того, подходит ли больной для противораковой терапии, включающей в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1, при этом способы предусматривают отбор больного с солидной опухолью, введение меченого радиоактивной меткой коньюгата антитела в соответствии с настоящим раскрытием и визуализацию локализации введенного меченого радиоактивной меткой коньюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ визуализации, при этом наличие меченого радиоактивной меткой коньюгата антитела в опухоли идентифицирует больного как подходящего для противораковой терапии, включающей в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1.

**[0160]** Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам идентификации кандидата для противораковой терапии, включающей в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1, при этом способы предусматривают отбор больного с солидной опухолью, введение меченого радиоактивной меткой коньюгата антитела в

соответствии с настоящим раскрытием и визуализацию локализации введенного меченого радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ визуализации, при этом наличие меченого радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли идентифицирует больного как подходящего для противораковой терапии, включающей в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1.

**[0161]** Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам прогнозирования ответа больного на противораковую терапию, включающую в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1, при этом способы предусматривают отбор больного с солидной опухолью, определение того, является ли опухоль PD-L1-позитивной, при этом прогнозируют позитивный ответ больного, если опухоль является PD-L1-позитивной. Согласно некоторым вариантам осуществления опухоль определяют как позитивную путем введения меченого радиоактивной меткой конъюгата антитела в соответствии с настоящим раскрытием и визуализации локализации меченого радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ визуализации, при этом наличие меченого радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является PD-L1-позитивной.

**[0162]** Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам выявления PD-L1-позитивной опухоли у субъекта. Способы согласно данному аспекту предусматривают отбор субъекта с солидной опухолью; введение меченого радиоактивной меткой конъюгата антитела в соответствии с настоящим раскрытием субъекту и определение локализации меченого радиоактивной меткой конъюгата антитела с помощью ПЭТ визуализации, при этом наличие меченого радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является PD-L1-позитивной.

**[0163]** Используемое в настоящем документе выражение «субъект, нуждающийся в этом» означает человека или отличное от человека млекопитающее, которые проявляют один или несколько симптомов или признаков злокачественной опухоли, и/или которым был поставлен диагноз злокачественной опухоли, в том числе солидной опухоли, и которые нуждаются в лечении ее. Во многих вариантах осуществления термин «субъект» может взаимозаменяется использоваться с термином «больной». Например, у субъекта-человека может быть диагностирована первичная или метастатическая опухоль и/или один или несколько симптомов или показаний, в том числе без ограничения необъяснимая потеря массы, общая слабость, постоянная усталость, потеря аппетита, лихорадка, ночная потливость, боль в костях, одышка, вздутый живот, боль/давление в груди, увеличение селезенки и повышение уровня связанного со злокачественной опухолью биомаркера

(например, CA125). Данное выражение включает в себя субъектов с первичными или установленными опухолями. Согласно конкретным вариантам осуществления выражение включает в себя субъектов-людей, которые имеют солидную опухоль и/или нуждаются в лечении солидной опухоли, например, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака легкого, рака предстательной железы, рака кожи, рака печени, рака кости, рака яичника, рака шейки матки, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи и рака головного мозга. Термин включает в себя субъектов с первичными или метастатическими опухолями (запущенными злокачественными новообразованиями). Согласно некоторым вариантам осуществления выражение «субъект, нуждающийся в этом» включает в себя больных с солидной опухолью, которая устойчива или не поддается лечению или недостаточно контролируется предшествующей терапией (например, лечением противораковым средством). Например, выражение включает в себя субъектов, которых лечили одной или несколькими линиями предшествующей терапии, такой как лечение химиотерапией (например, карбоплатином или доцетакселом). Согласно некоторым вариантам осуществления выражение «субъект, нуждающийся в этом» включает в себя больных с солидной опухолью, которых лечили одной или несколькими линиями предшествующей терапии, но которые впоследствии рецидивировали или метастазировали. Согласно некоторым вариантам осуществления термин включает в себя субъектов, имеющих воспалительное заболевание или нарушение, в том числе без ограничения злокачественную опухоль, ревматоидный артрит, атеросклероз, периодонтит, сенную лихорадку, болезнь сердца, болезнь коронарной артерии, инфекционное заболевание, бронхит, дерматит, менингит, астму, туберкулез, язвенный колит, болезнь Крона, воспалительное заболевание кишечника, гепатит, синусит, псориаз, аллергию, фиброз, волчанку, везикулит, анкилозирующий спондилит, болезнь Грейвса, целиакию, фибромиалгию и отторжение транспланта.

**[0164]** Согласно некоторым вариантам осуществления способы в соответствии с настоящим раскрытием используют для субъекта с солидной опухолью. Термины «опухоль», «рак» и «злокачественная опухоль» используются в настоящем документе взаимозаменяющими. Используемый в настоящем документе термин «солидная опухоль» относится к аномальной массе ткани, которая обычно не содержит кист или областей жидкости. Солидные опухоли могут быть доброкачественными (нераковыми) или злокачественными (раковыми). Для целей настоящего раскрытия термин «солидная опухоль» означает злокачественные солидные опухоли. Термин включает в себя различные типы солидных опухолей, названные по типу клеток, которые их формируют, а именно саркомы, карциномы и лимфомы. Согласно некоторым вариантам осуществления

термин «солидная опухоль» включает в себя злокачественные опухоли, в том числе без ограничения колоректальный рак, рак яичника, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак головного мозга, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак анального канала, рак матки, рак толстой кишки, рак печени, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак эндометрия, рак кости, рак яичка, рак кожи, рак почки, рак желудка, рак пищевода, рак головы и шеи, рак слюнной железы и миелому.

**[0165]** Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам лечения опухоли у субъекта. Способы согласно данному аспекту предусматривают отбор субъекта с солидной опухолью; определение того, что опухоль является PD-L1-позитивной; и введение одной или нескольких доз ингибитора сигнальной оси PD-1/PD-L1.

**[0166]** Согласно некоторым вариантам осуществления опухоль определяют как PD-L1-позитивную путем введения меченного радиоактивной меткой коньюгата антитела в соответствии с настоящим раскрытием субъекту и визуализации меченого радиоактивной меткой коньюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ визуализации, при этом наличие меченого радиоактивной меткой коньюгата антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является PD-L1-позитивной.

**[0167]** Используемый в настоящем документе термины «лечить», «лечение» или т. п. означают облегчение симптомов, устранение причины симптомов либо на временной, либо на постоянной основе, задержку или ингибирование роста опухоли, уменьшение нагрузки опухолевых клеток или опухолевой нагрузки, обеспечение регрессии опухоли, обеспечение сокращения опухоли, некроза и/или исчезновения, предотвращение рецидива опухоли, предотвращение или ингибирование метастазирования, ингибирование роста метастатической опухоли и/или увеличение продолжительности выживания субъекта.

**[0168]** Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам мониторинга эффективности противораковой терапии у субъекта, при этом способы предусматривают отбор субъекта с солидной опухолью, при этом субъект получает лечение противораковой терапией; введение меченого радиоактивной меткой коньюгата антитела в соответствии с настоящим раскрытием субъекту; визуализацию локализации введенного меченого радиоактивной меткой коньюгата в опухоли с помощью ПЭТ визуализации; и определение роста опухоли, при этом снижение от исходного уровня меченого радиоактивной меткой сигнала указывает на регрессию опухоли и эффективность противораковой терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления противораковая терапия включает в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 (например, антитело против PD-1).

**[0169]** Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к

способам оценки изменений в воспалительном состоянии опухоли, при этом способы предусматривают отбор субъекта с солидной опухолью, при этом субъект получает лечение противораковой терапией; введение меченного радиоактивной меткой коньюгата антитела, представленного в настоящем документе, субъекту и визуализацию локализации введенного меченного радиоактивной меткой коньюгата в опухоли с помощью ПЭТ визуализации, при этом усиление от исходного уровня меченного радиоактивной меткой сигнала указывает усиление воспаления и эффективность противораковой терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления противораковая терапия включает в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 (например, антитело против PD-1).

**[0170]** Используемый в настоящем документе термин «исходный уровень» в отношении экспрессии PD-L1 в опухоли означает числовое значение поглощения меченного радиоактивной меткой коньюгата у субъекта до или во время введения дозы противораковой терапии. Поглощение меченного радиоактивной меткой коньюгата определяют с использованием способов, известных в уровне техники (см., например, Oosting et al 2015, J. Nucl. Med. 56: 63-69). Согласно некоторым вариантам осуществления противораковая терапия включает в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1.

**[0171]** Для определения наличия регрессии опухоли поглощению меченного радиоактивной меткой коньюгата количественно определяют во время исходного визита и в один или несколько моментов времени после введения ингибитора сигнальной оси PD-1/PD-L1 (например, антитела против PD-1). Например, поглощение введенного меченного радиоактивной меткой коньюгата антитела (например, меченного радиоактивной меткой коньюгата антитела против PD-L1) может быть измерено в день 2, день 3, день 4, день 5, день 6, день 7, день 8, день 9, день 10, день 11, день 12, день 14, день 15, день 22, день 25, день 29, день 36, день 43, день 50, день 57, день 64, день 71, день 85 или в конце недели 1, недели 2, недели 3, недели 4, недели 5, недели 6, недели 7, недели 8, недели 9, недели 10, недели 11, недели 12, недели 13, недели 14, недели 15, недели 16, недели 17, недели 18, недели 19, недели 20, недели 21, недели 22, недели 23, недели 24 или позже после начала лечения ингибитором сигнальной оси PD-1/PD-L1 (например, антителом против PD-1). Разницу между значением поглощения в конкретный момент времени после начала лечения и значением поглощения на исходном визите используют для установления того, была ли разница в количестве опухолевой ткани (регрессии или прогрессирования опухоли). Например, снижение по сравнению с исходным значением поглощения при лечении по меньшей мере одной дозой ингибитора сигнальной оси PD-1/PD-L1 означает регрессию опухоли и указывает на эффективность противораковой терапии.

**[0172]** Согласно некоторым вариантам осуществления меченный радиоактивной меткой

конъюгат антитела вводят субъекту внутривенно или подкожно. Согласно некоторым вариантам осуществления меченный радиоактивной меткой конъюгат антитела вводят внутрь опухоли. После введения меченный радиоактивной меткой конъюгат антитела локализуется в опухоли. Локализованный меченный радиоактивной меткой конъюгат антитела визуализируют с помощью ПЭТ визуализации, а поглощение меченого радиоактивной меткой конъюгата антитела опухолью измеряют способами, известными в уровне техники. Согласно некоторым вариантам осуществления визуализацию осуществляют через 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней после введения меченого радиоактивной меткой конъюгата. Согласно некоторым вариантам осуществления визуализацию осуществляют в тот же день после введения меченого радиоактивной меткой конъюгата антитела.

**[0173]** Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело против PD-L1 содержит CDR HCVR, при этом HCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 34, 50, 82, 98, 146, 162, 178, 186, 234, 250, 290, 306, 314 и 330; и CDR LCVR, при этом LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 42, 58, 90, 106, 154, 170, 194, 242, 258 и 274.

**[0174]** Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело против PD-1 выбрано из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба и REGN2810. Согласно некоторым другим вариантам осуществления ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-L1. Согласно одному варианту осуществления антитело против PD-L1 представляет собой атезолизумаб. Согласно одному варианту осуществления антитело против PD-L1 содержит HCVR согласно SEQ ID NO: 82 и LCVR согласно SEQ ID NO: 90.

#### **IV. Примеры**

**[0175]** Некоторые варианты осуществления настоящего раскрытия иллюстрируются следующими неограничивающими примерами.

##### **Пример 1. Создание человеческих антител против PD-L1**

**[0176]** Человеческие антитела против PD-L1, в том числе приведенные в таблице 1,

получали и характеризовали, как описано в публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Вкратце, человеческие антитела против PD-L1 создавали с использованием фрагмента PD-L1, который варьирует в пределах приблизительно 19-239 аминокислот PD-L1 (регистрационный номер в Genbank NP\_054862.1). Иммуноген вводили непосредственно, с адьювантом для стимуляции иммунного ответа мышам VELOCIMMUNE®, содержащим ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой и каппа легкой цепей человеческого иммуноглобулина. Опосредованный антителами иммунный ответ контролировали с помощью PD-L1-специфического иммуноанализа. Когда достигался желаемый иммунный ответ, спленоциты собирали и сливали с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и формирования линии гибридомных клеток. Линии гибридомных клеток скринировали и отбирали для идентификации клеточных линий, которые продуцируют PD-L1-специфические антитела. С использованием этой методики и описываемого выше иммуногена получали несколько химерных антител против PD-L1 (т. е. антител, обладающих человеческими вариабельными доменами и мышиными константными доменами); иллюстративные антитела, созданные данным способом, обозначали как H2M8306N, H2M8307N, H2M8309N, H2M8310N, H2M8312N, H2M8314N, H2M8316N, H2M8317N, H2M8321N, H2M8323N, H2M8718N, H2M8718N2 и H2M8719N.

**[0177]** Антитела против PD-L1 также выделяли непосредственно из антиген-позитивных В-клеток без слияния с миеломными клетками, как описано в патентном документе США № US 2007/0280945A1, специально включенном в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. С использованием этого способа получали несколько полных человеческих антител против PD-L1 (т. е. антител, обладающих человеческими вариабельными доменами и человеческими константными доменами); иллюстративные антитела, созданные данным способом, обозначали как H1H9323P, H1H9327P, H1H9329P, H1H9336P, H1H9344P2, H1H9345P2, H1H9351P2, H1H9354P2, H1H9364P2, H1H9373P2, H1H9382P2, H1H9387P2 и H1H9396P2.

## Пример 2. Конъюгация антитела против PD-L1 H4H8314N с p-SCN-Bn-DFO

**[0178]** Для модификации исходного антитела против PD-L1 H4H8314N и изотипного контрольного антитела, чтобы оно подходило для исследований с помощью иммуно-ПЭТ с мечением радиоактивной меткой, к антителу присоединяли хелатор p-SCN-bn-деферохамин (DFO; Macrocylics, № по каталогу B-705).

**[0179]** Для модификации H4H8314N сначала гистидиновый буфер заменяли на PBS, pH

7,2, путем диализа при 4°C на протяжении ночи (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette G2 10k MWCO; ThermoScientific), затем снова заменяли буфер с использованием колонки PD-10 (GE Healthcare, № по каталогу 17-0851-01) на буфер, состоящий из 50 mM карбонатного буфера, 150 mM NaCl, pH 9,0 (буфер для конъюгации). Для определения концентрации после замены буфера образцы измеряли на спектрометре Nanodrop 2000 UV/VIS (Thermo Scientific) с использованием коэффициента экстинкции на основе последовательности MacVector 1,46 г/л (см. таблицу 2). В 15-мл полиэтиленовой пробирке добавляли 773,9 мкл H4H8314N (12,5 мг) к 1676,1 мкл буфера для конъюгации. В отдельном сосуде 29,3 мкл DMSO добавляли к 20,7 мкл DFO. Этот раствор DFO по одной четверти добавляли в раствор H1H8314N, каждый раз осторожно перемешивая пипеткой вверх-вниз. Конечный раствор представлял собой 5 мг/мл H4H8314N в буфере для конъюгации, 2% DMSO с 6-кратным мольным избытком DFO. Обеспечивали инкубацию этого раствора в водяной бане при 37°C без дополнительного перемешивания.

**[0180]** Через 30 минут при 37°C раствор быстро пропускали через колонку для обессоливания PD-10 (GE Healthcare, № по каталогу 17-0851-01), предварительно уравновешенную буфером, содержащим 250 mM NaAcO при pH 5,4 (буфером для составления). Конечный раствор стерильно фильтровали через шприцевой фильтр (13-мм шприцевой фильтр Acrodisc, Pall Corporation, № по каталогу 4602). Затем концентрацию и отношение DFO к антителу (DAR) измеряли с помощью UV/VIS спектроскопии. Для измерения поглощения антитело, конъюгированное с DFO, измеряли в сопоставлении с буфером для составления при 252 нм (A252), 280 нм (A280) и 600 нм (A600). Для расчета фон корректировали при каждом значении поглощения с использованием уравнения:

$$A'_\lambda = A_\lambda - A_{600}$$

**[0181]** Коньюгат антитела тестировали на предмет агрегации с использованием SEC хроматографии, при этом 25 мкг образца вводили в колонку Superdex 200 (GE Healthcare, № по каталогу 17-5175-01), контролировали при 280 нм с помощью подвижной фазы PBS (0,75 мл/минута). Целостность антитела оценивали с помощью 4-20% готового геля Tris/Gly для SDS-PAGE (Novex) с 2 мкг загруженного образца. Гель показан на фиг. 1. Концентрацию антител, концентрацию коньюгата и DAR рассчитывали с использованием приведенных ниже уравнений:

#### вычисление концентрации антитела

$$\text{Конц. mAb (мг/мл)} = \frac{A'_{280}}{\epsilon_{280}},$$

### вычисление концентрации конъюгата

$$\text{Конц. конъюгата (мг/мл)} = \frac{A'_{252} - 1.53 A'_{280}}{\epsilon_{252} - 1.53 \epsilon_{280}},$$

### вычисление DAR

$$\text{DAR} = \frac{\epsilon_{252} A'_{280} - \epsilon_{280} A'_{252}}{18800 A'_{252} - 28700 A'_{280}}.$$

**Таблица 2. Молярные коэффициенты экстинкции и молярная масса**

Антитело	MW (г моль <sup>-1</sup> )	$\epsilon_{280}$ (л г <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup> )	$\epsilon_{252}$ (л г <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup> )
H4H8314N	144984	1,46	0,553

**Таблица 3. UV DAR, процент агрегата и концентрация после присоединения DFO**

Антитело	UV DAR	Концентрация (мг/мл)	% агрегата
H4H8314N	1,2	3,34	< 1%

### Пример 3. Хелатирование <sup>89</sup>Zr конъюгированного с DFO моноклонального антитела

[0182] Для применения в иммуно-ПЭТ *in vivo* исследованиях конъюгированное с DFO антитело против PD-L1, H4H8314N, и конъюгированное с DFO антитело контрольного изотипа метили радиоактивной меткой с <sup>89</sup>Zr.

[0183] Конъюгированное с DFO антитело (250 или 750 мкг) сначала доводили до 1,25 мг/мл в 1 М HEPES, pH 7,2. Состав раствора конъюгата DFO-Ab для каждого исследования приведен в таблице 4. Отдельно готовили раствор <sup>89</sup>Zr с использованием состава для каждого соответствующего исследования, показанного в таблице 5. Маточный раствор <sup>89</sup>Zr-щавелевой кислоты получали от PerkinElmer или 3D Imaging. Если концентрация радиоактивности маточного раствора была низкой (см. таблицу 5), то выполняли стадию нейтрализации с помощью 1 М бората, pH 9,0. Конечную радиоактивность раствора сначала подтверждали с использованием дозкалибратора Capintec CRC-25R (Capintec, № 520), затем сразу же объединяли с раствором конъюгата DFO-Ab, осторожно смешивали (перемешивали в пипетке), а затем инкубировали в течение 45 минут при комнатной температуре.

[0184] После инкубации брали небольшой образец из каждой реакционной смеси для

iTLC (мгновенной тонкослойной жидкостной хроматографии) для определения мечения радиоактивной меткой реакционного выхода, а оставшиеся реакционные смеси переносили в предварительно уравновешенные колонки PD-10 (Vendor) с 250 mM ацетата натрия при pH 5,4 для обессоливания с гравитационной подачей. Каждая колонка PD-10 вмещала не более чем 1,2 мл реакционной смеси (в ином случае использовали несколько колонок). После того, как содержимое реакционной смеси поступило в слой колонки, добавляли 1,6 мл 250 mM ацетата натрия при pH 5,4 (буфера для составления); проточную фракцию отбрасывали. Дополнительные 1,8 мл буфера для составления добавляли в колонку и элюат собирали из каждой колонки. Затем приблизительно 500 мкл каждого раствора анализировали с использованием спектрофотометра Nanodrop (ThermoScientific). Конечную концентрацию Ab рассчитывали с использованием соответствующего коэффициента экстинкции и поглощения при 280 нм с использованием уравнения: концентрация в мг/мл = поглощение при 280 нм ÷ коэффициент экстинкции при 280 нм (находится в таблице 6).

**[0185]** Конечная масса, измеренная в граммах, записана в таблице 4. Затем измеряли радиоактивность с использованием дозкалибратора и представляли в таблице 5. Затем конечный материал вместе с материалом до обработки в колонке PD-10 анализировали с помощью iTLC. Для этого анализа 1 мкл каждого раствора добавляли на хроматографическую бумагу из микроволокна iTLC-SG-Glass, пропитанную силикагелем (Agilent Technologies, № по каталогу SG10001), обработанную в камере TLC с 20 mM буферного раствора на основе лимонной кислоты. Конечный материал также анализировали с использованием SEC-HPLC с UV 280 и радиоизотопным детектором, соединенным последовательно (Agilent 1260 с Lablogic Radio-TLC/HPLC Detector, SCAN-RAM), с использованием колонки Superdex 200 с подвижной фазой PBS при скорости потока 0,75 мл/минута. Использовали Radiotrace для определения радиохимической чистоты путем сравнения интеграции пика белка (~10-16 минут) и свободного пика <sup>89</sup>Zr (~25 минут). Чистоту мономера определяли путем сравнения интеграции олигомерного пика (от 10 минут до ~15 минут) с мономером (~16 минут).

**[0186]** Удельную активность и восстановление белка (%) каждого меченого радиоактивной меткой коньюгата определяли с использованием следующих уравнений:

- a. масса коньюгата в мг = концентрация в мг/мл × масса раствора в граммах;
- b. удельная активность в мКи/мг = активность сосуда в мКи ÷ масса коньюгата в мг;
- c. восстановление белка = исходная масса коньюгата (мг) ÷ масса коньюгата в мг.

**[0187]** Наконец, внешний вид отмечали и регистрировали в таблице 7. И UV280, и iTLC

меченое вещество определяли на очищенном продукте.

**[0188]** Результаты приведены в таблице 7. Хроматограммы радио-SEC-HPLC показаны на фиг. 2-4. Пример хроматограммы SEC UV280 HPLC и радио-iTLC показан на фиг. 5 для мечения радиоактивной меткой  $^{89}\text{Zr}$ , исследование 1. Хроматограмма SEC UV280-HPLC подтверждает высокомономерный продукт (99%). След радио-iTLC обрабатывали с помощью 7-точечной биномиальной функции сглаживания. Начало и фронт растворителя составляли примерно 16 и 100 мм, соответственно. За пределами 22 мм не обнаруживали выявляемого  $^{89}\text{Zr}$ , что подтверждает радиохимическую чистоту, определенную с помощью SEC радио-SEC-HPLC на фиг. 2В.

**Таблица 4. Получение коньюгата DFO-антитело для мечения радиоактивной меткой**

№ мечения радиоактивной меткой	№ исследования	Партия мечения радиоактивной меткой	Концентрация (мг/мл)	DAR*	Масса коньюгата (мг)	Суммарный объем (мкл)	Конечная концентрация (мг/мл)
1	1	Изотип-DFO- $^{89}\text{Zr}$	3,7	1,6	250	200	1,25
2	1	H4H8314N-DFO- $^{89}\text{Zr}$	3,34	1,2	250	200	1,25
3	2	H4H8314N-DFO- $^{89}\text{Zr}$	3,34	1,2	750	600	1,25
4	3	Изотип-DFO- $^{89}\text{Zr}$	3,7	1,6	250	200	1,25
5	3	H4H8314N-DFO- $^{89}\text{Zr}$	3,34	1,2	250	200	1,25

\* DAR определяют как отношение DFO к антителу.

**Таблица 5. Получение реакционного раствора  $^{89}\text{Zr}$  для мечения радиоактивной меткой**

Мечение радиоактивной меткой	№ исследования	Партия мечения радиоактивной меткой	$^{89}\text{Zr}$ -оксалат (мкл)	Дополнительное добавление 1 М щавлевой кислоты (мкл)	Добавление 1 М бората, pH 9,0 (мкл)	1 М НЕРЕS, pH 7,2 (мкл)	Конечный объем (мкл)	Конечная активность (мкКи/мкл)	Удельная активность (мкКи/мкл)
1	1	Изотип-DFO- $^{89}\text{Zr}$	50	50	400	500	1000	1009	1,01

2	1	H4H8314 N-DFO- <sup>89</sup> Zr	50	50	400	500	1000	1000	1
3	2	H4H8314 N-DFO- <sup>89</sup> Zr	150	150	1200	1500	3000	3070	1,02
4	3	Изотип- DFO- <sup>89</sup> Zr	~1	0	0	1000	1000	1680	1,68
5	3	H4H8314 N-DFO- <sup>89</sup> Zr	~1	0	0	1000	1000	1640	1,64

Таблица 6. Коэффициенты экстинкции для партий конъюгатов

Партия мечения радиоактивной меткой	$\epsilon_{280}$ (AU мл мг <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup> )
Изотип-DFO- <sup>89</sup> Zr	1,71
H4H8314N-DFO- <sup>89</sup> Zr	1,61

Таблица 7. Краткое описание меченых <sup>89</sup>Zr конъюгатов DFO-Ab для *in vivo* визуализации и исследований биораспределения

Мечени е ра диоак тивн ой метк ой	№ иссле дова ния	Партии конъюгато в	Внеш ний вид	Радиох имиче ская чистот а* (%)	Моно мерна я чисто та* (%)	Восст ановл ение белка (%)	Концен трация (мг/мл)	Удельная активнос ть (мКи/мг)
1	1	Изотип- DFO- <sup>89</sup> Zr	Прозр ачный	>99%	>95%	60%	0,106	3,35
2	1	H4H8341N- DFO- <sup>89</sup> Zr	Прозр ачный	>99%	>95%	63%	0,121	2,75
3	2	H4H8341N- DFO- <sup>89</sup> Zr	Прозр ачный	>99%	>95%	62%	0,134	3,58
4	3	Изотип- DFO- <sup>89</sup> Zr	Прозр ачный	>99%	>95%	66%	0,074	5,38
5	3	H4H8341N- DFO- <sup>89</sup> Zr	Прозр ачный	>99%	>95%	74%	0,084	5,13

\* с помощью радио-SEC-HPLC.

#### Пример 4. Иммунореактивность

[0189] Иммунореактивность (IR) меченого радиоактивной меткой антитела против PD-L1 и антитела контрольного изотипа измеряли следующим образом. Для начальных

исследований использовали клетки C38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup>, а затем также использовали клетки LOX-IMVI (см. подробное описание клеточных линий в примере 5) в дальнейшем исследовании. В данных анализах добавляли 20 нг соответствующих меченых <sup>89</sup>Zr антител в  $15 \times 10^6$  клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup> или  $30 \times 10^6$  клеток LOX-IMVI в конечном объеме 1 мл. Образцы инкубировали в течение 45 минут при непрерывном перемешивании, а затем подвергали 3 промывкам со средой для удаления какого-либо несвязанного антитела. Затем подсчитывали радиоактивность тестируемых клеточных масс с помощью автоматического счетчика гамма-излучения (Wizard 2470, Perkin Elmer) против 2 эталонных стандартов, содержащих те же 20 нг меченого <sup>89</sup>Zr антитела. Процентное содержание иммунореактивности определяли для образцов с использованием среднего значения стандартов в качестве меры суммарной активности.

**[0190]** Как видно из таблицы 8, меченое <sup>89</sup>Zr антитело против PD-L1 сохраняло иммунореактивность после конъюгации и мечения радиоактивной меткой, при этом % IR варьировала от 88 до 98% в исследованиях. Специфичность связывания очевидна в отношении контрольных антител, имеющих исходный уровень % IR менее чем 1%.

**Таблица 8. Иммунореактивность DFO-конъюгатов с хелатированным <sup>89</sup>Zr**

Исследование	Исследование 1		Исследование 2		Исследование 3			
Клеточная линия	MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 <sup>-/-</sup> hPD-L1 <sup>Tg</sup>		MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 <sup>-/-</sup> hPD-L1 <sup>Tg</sup>		MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 <sup>-/-</sup> hPD-L1 <sup>Tg</sup>		LOX-IMVI	
Антитело	<sup>89</sup> Zr-антитело против PD-L1	<sup>89</sup> Zr-контроль	<sup>89</sup> Zr-антитело против PD-L1	<sup>89</sup> Zr-контроль	<sup>89</sup> Zr-антитело против PD-L1	<sup>89</sup> Zr-контроль	<sup>89</sup> Zr-антитело против PD-L1	<sup>89</sup> Zr-контроль
Активность клеточной массы	4048,4	29,6	8311,9	Нет данных	6262,4	68	5587,54	65,4
Средняя стандартная активность	4536,5	6432,4	8567,2	Нет данных	6386,6	9544,8	6386,6	9544,8
Процент IR	89,2	0,5	97,0	Нет данных	98,1	0,7	87,5	0,7

**Пример 5. *In vitro* и *ex vivo* характеристика экспрессии PD-L1 человека в линиях опухолевых клеток**

[0191] Несколько линий опухолевых клеток исследовали для оценивания уровня экспрессии PD-L1 человека с целью выявления PD-L1 человека, эндогенно экспрессируемого опухолями *in vivo*, у самцов голых мышей NCr (Taconic, Hudson NY) или у мышей, которых модифицировали для гомозиготности по экспрессии внеклеточного домена PD-L1 человека вместо внеклеточного домена PD-L1 мыши (мышей PD-L1 HumIn) на фоне штамма 75% C57/Bl6/25% 129 с использованием технологии VelociGene® (Valenzuela et al 2003, Nat. Biotechnol. 21: 652-659; публикация заявки на выдачу патента США № US 2016/0157469).

[0192] Клеточные линии, используемые в данный исследованиях, включают в себя: 1) клеточную линию карциномы толстой кишки мыши MC38 (полученную из NCI при Frederick, MD, Laboratory of Tumor Immunology and Biology), которая была сконструирована для нокаута PD-L1 мыши, но надэкспрессирует полноразмерный PD-L1 человека и полноразмерный куриный овальбумин, слитый с eGFP, таким образом, упоминаемый в настоящем документе как MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup>); 2) несколько линий опухолевых клеток человека: клеточную линию меланомы человека LOX-IMVI (эндогенную PD-L1-позитивную линию, полученную из NCI при Frederick, MD, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, Tumor Repository), клеточные линии рака молочной железы человека MDA-MB-231 (эндогенную PD-L1-позитивную линию) и SK-Br-3 (PD-L1-негативную клеточную линию) (обе получены из ATCC). В некоторых случаях PD-L1 человека оценивали напрямую без какой-либо индукции *in vitro*; в некоторых случаях экспрессию PD-L1 человека оценивали с помощью обработки на протяжении ночи мышным или человеческим IFN $\gamma$  (100 нг/мл) (полученным от Peprotech); в некоторых случаях PD-L1 человека оценивали *ex vivo* на ферментативно диссоциированных опухолевых клетках, выделенных от голых несущих опухоль мышей или гуманизированных мышей. Все поверхностное окрашивание PD-L1 человека выполняли в соответствии со стандартным протоколом. Вкратце, опухолевые клетки промывали PBS один раз, один раз промывали ледяным буфером для окрашивания, окрашивали коммерчески доступным непосредственно конъюгированным с флуорохромом антителом против PD-L1 человека (eBioscience, клон MIH1) в буфере для окрашивания в течение 30 минут на льду в темноте, и затем снова промывали 2 мл PBS. Устранимый краситель eFluor506 также включали в соответствии с протоколом производителя (eBioscience, № по каталогу 17-5983). Образцы получали на BD FACSCanto II™ IVD10, оборудованном DIVA v8. Данные далее анализировали с помощью FlowJo

v10.0.6 или выше.

**[0193]** Экспрессия PD-L1 клетками MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup> до имплантации и через несколько дней после имплантации у голых мышей показана в таблице 9.

**Таблица 9. Процентное содержание позитивных по PD-L1 человека клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup> до имплантации и через 7 дней после имплантации у голых мышей**

	Окрашивание изотипом	Окрашивание hPD-L1
До имплантации	0,6%	94,7%
После имплантации	1,09%	74,0%

**[0194]** Перед имплантацией подавляющее большинство клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup> были позитивными по PD-L1 человека по сравнению с окрашиванием контрольным изотипом. Через несколько дней после имплантации голым мышам и после ферментативной и механической обработки для диссоциации опухоли ~70% клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup> все еще оставались позитивными по PD-L1 человека.

**[0195]** Экспрессия PD-L1 клетками MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup> до имплантации и через четырнадцать дней после имплантации у PD-L1 гуманизированных мышей показана в таблице 10.

**Таблица 10. Процентное содержание позитивных по PD-L1 человека клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup> до имплантации и через 14 дней после имплантации у PD-L1 гуманизированных мышей**

	Окрашивание изотипом	Окрашивание hPD-L1
До имплантации	0,2%	92,5%
После имплантации	3,6	46,2%

**[0196]** Перед имплантацией подавляющее большинство клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup> были позитивными по PD-L1 человека по сравнению с окрашиванием контрольным изотипом. Через четырнадцать дней после имплантации у PD-L1/PD-L1 дважды гуманизированных мышей и после ферментативной и механической обработки для диссоциации опухоли ~50% клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup> все еще оставались позитивными по PD-L1 человека.

**[0197]** Экспрессия PD-L1 многочисленными линиями опухолевых клеток *in vitro* показана на фиг. 6. Для оценивания того, насколько сопоставим уровень экспрессии PD-L1, с

помощью сконструированной клеточной линии (MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup>) и других линий опухолевых клеток человека (клеток меланомы LOX-IMVI, клеток рака молочной железы MDA-MB-231 и клеток рака молочной железы SK-Br-3) проводили титрование дозы окрашивания антителами против PD-L1. На фиг. 6 показано, что клетки MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup> характеризовались самым высоким уровнем экспрессии PD-L1 человека (фиг. 6A), а клетки SK-Br-3 характеризовались самой низкой экспрессией без выявления PD-L1 (фиг. 6D), тогда как экспрессия PD-L1 клетками LOX-IMVI и MDA-MB-231 была умеренной (приблизительно в 5 раз ниже, чем в клетках MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup>) (фиг. 6B и 6C).

**[0198]** Во втором эксперименте дальнейшее сравнение между клетками LOX-IMVI и MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup> проводили с обработкой *in vitro* или без таковой с помощью 100 нг/мл hIFN $\gamma$ /mIFN $\gamma$  в течение ночи, соответственно. На фиг. 7 показано, что средняя интенсивность флуоресценции PD-L1 достигала плато при ~150 нМ антитела против PD-L1, используемого для окрашивания. На исходном уровне экспрессия PD-L1 клетками LOX-IMVI была умеренной (приблизительно в 6-7 раз ниже, чем у клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup>). После обработки mIFN $\gamma$  не наблюдали изменений в окрашивании PD-L1 в клетках MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup>, тогда как наблюдали 3-кратное усиление окрашивания PD-L1 человека в клетках LOX-IMVI после обработки с hIFN $\gamma$ .

**[0199]** Экспрессия PD-L1 *ex vivo* клетками LOX-IMVI и MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup> примерно через три недели после имплантации голым мышам была показана в таблицах 11 и 12.

**Таблица 11. Процентное содержание PD-L1 позитивных клеток LOX-IMVI и MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup> через ~3 недели после имплантации у голых мышей**

	Окрашивание изотипом	Окрашивание hPD-L1
LOX-IMVI	0,2%	56,6%
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 <sup>-/-</sup> hPD-L1 <sup>Tg</sup>	0,2%	96,2%

**Таблица 12. Средняя интенсивность флуоресценции PD-L1 в клетках LOX-IMVI и MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup> через ~3 недели после имплантации у голых мышей**

	Опухоль 1	Опухоль 2
LOX-IMVI	8479,1	12121,5
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 <sup>-/-</sup> hPD-L1 <sup>Tg</sup>	49589,1	51445,0

**[0200]** После ферментативной и механической обработки для обеспечения диссоциации опухоли клетки окрашивали антителом против PD-L1 (20 мкг/мл). Уровень экспрессии PD-L1 в клетках LOX-IMVI был приблизительно 5 раз ниже такового в опухолевых клетках MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup>.

**Пример 6. Селективная локализация меченного радиоактивной меткой антитела против PD-L1 в hPD-L1 позитивных опухолях у голых мышей**

**[0201]** Для определения *in vivo* локализации антитела против PD-L1 меченный цирконием-89 конъюгат DFO-антитело вводили внутривенно голым мышам, несущим PD-L1 позитивные опухоли.

**[0202]** Опухолевая линия, используемая для исследования, представляла собой клеточную линию карциномы толстой кишки мыши, называемую MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup>, которая была сконструирована для нокаута PD-L1 мыши из MC38 дикого типа, но надэкспрессировала полноразмерный PD-L1 человека и полноразмерный куриный овальбумин, слитый с eGFP. Для второго исследования опухолей с эндогенной экспрессией PD-L1 человека клеточную линию меланомы человека LOX-IMVI использовали для установления опухолей *in vivo* для последующих исследований локализации антител против PD-L1.

**[0203]** Иллюстративным меченым радиоактивной меткой антителом против PD-L1, используемым для данного исследования, было H1H8314N, включающие в себя HCVR/LCVR согласно SEQ ID NO: 82/90.

**[0204]** Для первого исследования  $1 \times 10^6$  клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup> имплантировали подкожно в левый бок самцам голых мышей NCr возрастом 8-10 недель (Taconic, Hudson NY). Для опухолей LOX-IMVI подкожно имплантировали  $1 \times 10^6$  клеток в левый бок самцов голых мышей NCr возрастом 8-10 недель. Как только опухоли достигали среднего объема 50-150  $\text{mm}^3$  (день ~7-10), мышей рандомизировали в группы и им вводили либо меченный <sup>89</sup>Zr конъюгат DFO-антитело против PD-L1 (H1H8314N), либо меченный <sup>89</sup>Zr не связывающий контрольный изотип конъюгата DFO-антитело. Голые мыши, несущие опухоли MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup>, получали  $50 \pm 1$  мКи меченого <sup>89</sup>Zr антитела с дозой белка ~0,6 мг/кг. В исследовании с использованием мышей, несущих опухоли LOX-IMVI, мыши получали  $35 \pm 1$  мКи меченого <sup>89</sup>Zr антитела с конечной дозой антитела 0,3 или 1 мг/кг.

**[0205]** ПЭТ визуализацию локализации антител оценивали через 6 дней после введения антител. Для получения изображений использовали Sofie Biosciences G8 PET/CT (Sofie Biosciences и Perkin Elmer). Прибор предварительно откалибровывали для выявления <sup>89</sup>Zr

до получения изображения. Энергетическое окно варьировало от 150 до 650 кэВ с восстановленным разрешением 1,4 мм в центре поля зрения. Мышей подвергали индукционной анестезии с использованием изофлурана и держали в непрерывном потоке изофлурана во время визуализации. Статические 10-минутные изображения получали с использованием программного обеспечения G8, а затем реконструировали с использованием предварительно сконфигурированных настроек. Данные изображений корректировали с учетом распада и других параметров. КТ-изображения получали после осуществления ПЭТ, а затем совместно регистрировали с ПЭТ-изображениями. Изображения готовили с использованием программного обеспечения VivoQuant для последующей обработки (inviCRO Imaging Services).

**[0206]** Для биораспределения мышей подвергали эвтаназии в конечный момент времени (через 5-6 дней после введения дозы) и собирали кровь с помощью пункции сердца. Опухоли и нормальные ткани затем вырезали и помещали в счетные трубки. Измеряли и регистрировали массу для каждого образца. Данные подсчета для  $^{89}\text{Zr}$  в СРМ затем собирали путем измерения образцов на автоматическом счетчике гамма-излучения (Wizard 2470, Perkin Elmer). Процент инъецированной дозы на грамм (% ID/g) рассчитывали для каждого образца с использованием стандартов, приготовленных из инъецируемого материала.

**[0207]** Среднее значение % ID/g для каждого антитела представлено в таблице 13.

**Таблица 13. Среднее значение % ID/g в анализируемых тканях**

<b>Образец</b>	$^{89}\text{Zr-H1H8314N}$		$^{89}\text{Zr-антитело}$ контрольного изотипа	
	<b>Среднее значение % ID/g</b>	<b>Ст. отклонение % ID/g</b>	<b>Среднее значение % ID/g</b>	<b>Ст. отклонение % ID/g</b>
Печень	3,1	0,4	0,9	0,9
Селезенка	4,4	1,1	1,5	1,3
Почка	4,0	0,7	1,4	1,6
Кость	5,1	2,6	1,7	1,6
Легкое	5,1	1,1	2,5	3,0
Сердце	2,4	0,2	1,3	1,4
Кровь	7,6	1,6	3,8	4,6
Тимус	5,3	3,0	2,8	2,2
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 <sup>-/-</sup> hPD-L1 <sup>Tg</sup>	55,3	12,2	3,0	3,3
Тонкий кишечник	1,5	0,3	0,6	0,6

**[0208]** Исходя из этого, явное высокое поглощение в опухолях MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1-/hPD-L1<sup>Tg</sup> было очевидным по сравнению с другими нормальными тканями, при этом поглощение в опухоли составляло 55,3% ID/г, что значительно превышало следующее самое высокое поглощение 5,3% ID/г, наблюдавшееся в тимусе. Поглощение в опухоли было в 7,3 раза и в 17,8 раза выше, чем активность в крови и печени, соответственно. Специфичность поглощения антитела против PD-L1 опухолью (55,3% ID/г) была очевидной по сравнению со значительно сниженным поглощением в опухоли на 3%, что наблюдали для не связывающего антитела контрольного изотипа. Выполненная в данном случае пилотная ПЭТ визуализация продемонстрировала четкую локализацию меченого <sup>89</sup>Zr коньюгата DFO-антитело против PD-L1 в опухолях MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1-/hPD-L1<sup>Tg</sup>. В момент времени в день 6 после введения дозы у животных наблюдали слабый фоновый сигнал. В отличие от четкой опухолевой локализации, которая была очевидна при использовании антитела против PD-L1, при визуализации контрольного антитела в данной модели была видна только слабая фоновая активность. Визуализация четко указывает на высокое специфическое поглощение антитела против PD-L1 в PD-L1-позитивной опухоли человека и показывает локализацию меченого радиоактивной меткой <sup>89</sup>Zr антитела против PD-L1 в опухоли MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1-/hPD-L1<sup>Tg</sup> у голой мыши NCr.

**[0209]** Во втором исследовании оценивали способность антитела против PD-L1 селективно нацеливаться на опухоли, экспрессирующие эндогенные уровни человеческого антигена PD-L1. В данном случае мыши, несущие опухоли меланомы LOX-IMVI человека, получали меченое <sup>89</sup>Zr антитело при дозах 0,3 и 1 мг/кг. Снова отбирали кровь, опухоль и ткани в день 6 после инъекции и вычисляли % ID/г для образцов. Среднее значение % ID/г для каждого антитела представлено в таблице 14.

**Таблица 14. Среднее значение % ID/г в анализируемых тканях из второго исследования (опухоли LOX-IMVI)**

<b>Образец</b>	<b><sup>89</sup>Zr-DFO-H1H8314N, 0,3 мг/кг</b>		<b><sup>89</sup>Zr-DFO-H1H8314N, 1 мг/кг</b>		<b><sup>89</sup>Zr-Антитело контрольного изотипа, 1 мг/кг</b>	
	<b>Среднее значение % ID/г</b>	<b>Ст. отклонение % ID/г</b>	<b>Среднее значение % ID/г</b>	<b>Ст. отклонение % ID/г</b>	<b>Среднее значение % ID/г</b>	<b>Ст. отклонение % ID/г</b>
Печень	2,9	0,3	3,3	0,2	3,9	0,3
Селезенка	4,2	0,2	4,3	0,9	4,2	0,7
Почка	4,3	0,4	4,3	0,8	3,4	0,4
Кость	3,2	0,6	2,7	0,5	3,6	0,4

Легкое	5,7	1,0	6,6	1,6	5,9	1,2
Сердце	3,2	0,8	3,2	0,4	2,9	0,6
Кровь	8,1	1,4	9,5	1,0	11,1	6,2
Тимус	5,3	2,3	5,6	0,7	4,9	1,4
Опухоль LOX-IMVI	20,6	2,7	10,6	2,6	12,0	1,8
Тонкий кишечник	1,5	0,2	1,8	0,4	2,0	0,3

[0210] При более низкой дозе 0,3 мг/кг наблюдали четкое нацеливание на опухоль, а не на нормальные ткани, при этом наблюдали 20,6% ID/g в опухолях LOX-IMVI. Когда мыши получали более высокую дозу 1 мг/кг, наблюдали пониженное на 10,6% ID/g поглощение опухолью относительно уровня 0,3 мг/кг. Это говорит о том, что более высокая доза белка и, возможно, последующая более высокая доля немеченого антитела приводили к блокированию поглощения опухолью меченного  $^{89}\text{Zr}$  антитела против PD-L1. В соответствии с этим ПЭТ визуализация, проведенная непосредственно перед исследованием биораспределения, также показала, что поглощение антитела против PD-L1 при дозе 1 мг/кг было примерно эквивалентно поглощению контрольного антитела. При более низкой дозе 0,3 мг/кг явное увеличение опухолевой локализации антитела против PD-L1 было очевидным по сравнению с контрольным антителом. В целом, изображения ПЭТ и данные биораспределения демонстрируют специфическое нацеливание на опухоли LOX-IMVI при дозе 0,3 мг/кг антитела против PD-L1.

#### **Пример 7. Селективная локализация меченного радиоактивной меткой антитела против PD-L1 в hPD-L1 позитивных опухолях у мышей**

[0211] В данном примере описывается локализация *in vivo* меченного цирконием-89 коньюгата DFO-антитело против PD-L1 у мышей, гуманизированных по PD-L1. Иллюстративным антителом, использованным в данном примере, было H1H8314N, включающие в себя HCVR/LCVR согласно SEQ ID NO: 82/90.

[0212] Мышей, гуманизированных по PD-L1, модифицировали с использованием технологии VelociGene® (Valenzuela et al. 2003, Nat. Biotechnol. 21: 652-659; публикация заявки на выдачу патента США № US 2016/0157469).

[0213] В качестве опухолевой линии использовали клеточную линию карциномы толстой кишки мыши, называемую MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup>, сконструированную для экспрессии полноразмерного куриного овальбумина, слитого с eGFP, и для нокаута PD-L1 мыши из MC38 дикого типа, но надэкспрессирующую полноразмерный PD-L1

человека.

**[0214]**  $1 \times 10^6$  клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup> имплантировали подкожно в левый бок самцов гуманизированных по PD-L1 мышей. Как только опухоли достигли среднего объема 50-150  $\text{мм}^3$  (день ~7), мышей рандомизировали в группы и им вводили дозу либо меченного  $^{89}\text{Zr}$  конъюгата DFO-антитело против PD-L1, либо меченного  $^{89}\text{Zr}$  конъюгата DFO-не связывающее антитело контрольного изотипа. Мыши получали  $50 \pm 1$  мКи меченного  $^{89}\text{Zr}$  антитела с конечной дозой белка 1 или 3 мг/кг.

**[0215]** ПЭТ визуализацию локализации антител оценивали через 6 дней после введения антител. Для получения изображений использовали Sofie Biosciences G8 PET/CT (Sofie Biosciences и Perkin Elmer). Прибор предварительно откалибровывали для выявления  $^{89}\text{Zr}$  до получения изображения. Энергетическое окно варьировало от 150 до 650 кэВ с восстановленным разрешением 1,4 мм в центре поля зрения. Мышей подвергали индукционной анестезии с использованием изофлурана и держали в непрерывном потоке изофлурана во время визуализации. Статические 10-минутные изображения получали с использованием программного обеспечения G8, а затем реконструировали с использованием предварительно сконфигурированных настроек. Данные изображений корректировали с учетом распада и других параметров. КТ-изображения получали после осуществления ПЭТ, а затем совместно регистрировали с ПЭТ-изображениями. Изображения готовили с использованием программного обеспечения VivoQuant для последующей обработки (inviCRO Imaging Services).

**[0216]** Для биораспределения мышей подвергали эвтаназии в конечный момент времени (через 5-6 дней после введения дозы) и собирали кровь с помощью пункции сердца. Опухоли и нормальные ткани затем вырезали и помещали в счетные трубки. Измеряли и регистрировали массу для каждого образца. Данные подсчета для  $^{89}\text{Zr}$  в СРМ затем собирали путем измерения образцов на автоматическом счетчике гамма-излучения (Wizard 2470, Perkin Elmer). Процент инъецированной дозы на грамм (% ID/г) рассчитывали для каждого образца с использованием стандартов, приготовленных из инъецируемого материала.

## Результаты

**[0217]** Гуманизированные по PD-L1 мыши, несущие опухоли MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup>, получали меченный  $^{89}\text{Zr}$  конъюгат DFO-антитело против PD-L1 при конечной дозе антитела 1 или 3 мг/кг. Кровь, опухоль и ткани собирали и взвешивали в день 6 после инъекции и вычисляли % ID/г для образцов на основании числа импульсов от каждого образца. Среднее значение % ID/г для дозы 1 и 3 мг/кг представлено в таблице 15 и

таблице 16, соответственно.

**Таблица 15. Среднее значение % ID/г в анализируемых тканях для антитела против PD-L1 при 1 мг/кг**

Образец	Среднее значение % ID/г	Ст. отклонение % ID/г
Печень	8,6	1,5
Селезенка	14,1	1,1
Почка	7,8	1,0
Кость	4,5	1,4
Легкое	7,9	3,0
Сердце	4,3	1,1
Кровь	9,1	4,6
Тимус	9,7	3,5
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 <sup>-/-</sup> hPD-L1 <sup>Tg</sup>	34,1	18,0
Тонкий кишечник	2,4	0,9

**[0218]** При уровне дозы 1 мг/кг выражено четкое нацеливание на опухоли MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup> с % ID/г 34,1% несмотря на экспрессию PD-L1 в нормальных тканях таких гуманизированных мышей. При этой дозе некоторая локализация меченного <sup>89</sup>Zr антитела против PD-L1 была очевидна в селезенке, где наблюдали поглощение антител 14,1% ID/г. Такое поглощение является закономерным из-за нормальной экспрессии PD-L1 человека вместо экспрессии PD-L1 мыши PD-L1 человека в селезенке. При дозе антитела 3 мг/кг локализация конъюгата <sup>89</sup>Zr-DFO-антитело против PD-L1 в селезенке была снижена, поскольку поглощение теперь в среднем составляло 9,7% ID/г у мышей, получавших эту дозу антитела (таблица 16).

**Таблица 16. Среднее значение % ID/г в анализируемых тканях для антитела против PD-L1 при 3 мг/кг**

Образец	Среднее значение % ID/г	Ст. отклонение % ID/г
Печень	6,7	1,4
Селезенка	9,7	1,3
Почка	7,0	1,1
Кость	3,6	0,6
Легкое	11,0	1,0
Сердце	4,7	0,7

Кровь	12,4	2,1
Тимус	7,6	0,5
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 <sup>-/-</sup> hPD-L1 <sup>Tg</sup>	28,7	13,1
Тонкий кишечник	0,4	0,2

**[0219]** При дозе 3 мг/кг все еще наблюдали четкое нацеливание на опухоль со средним значением 28,7% ID/г, принимаемым опухолями MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup>. Следовательно, хотя при визуализации при дозе 3 мг/кг было очевидно уменьшение локализации в нормальной ткани, четкая локализация меченых антител против PD-L1 в опухолях MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup> оставалась явной при данной дозе. В целом, эти результаты указывают на то, что четкое нацеливание на опухоли MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1<sup>-/-</sup>hPD-L1<sup>Tg</sup> было возможно у мышей, экспрессирующих PD-L1, на регулярных участках нормальной экспрессии в тканях.

**[0220]** Результаты исследований, выполняемых в данном случае, явно демонстрируют, что антитело против PD-L1, меченное <sup>89</sup>Zr, может значительной степени и специфически локализоваться в опухолях. Можно спрогнозировать сценарий, в котором антитело против PD-L1 используется при отборе больных с PD-L1-позитивными опухолями для последующего лечения ингибиторами сигнальной оси PD-1/PD-L1.

#### **Пример 8. Процесс крупномасштабного производства для получения коньюгатов DFO-антитело против PD-L1**

**[0221]** В данном примере подробно описывается процесс крупномасштабного производства для получения антитела против PD-L1, подходящего для мечения радиоактивной меткой путем присоединения p-SCN-bn-дефероксамина (DFO) к антителу против PD-L1 (mAb, H4H8314N), описываемому в настоящем документе: (1) процессы ультрафильтрации и диафильтрации (UFDF) перед коньюгацией mAb удаляли вспомогательные средства, которые ингибируют процесс коньюгации; (2) после UFDF предварительной коньюгации проводили коньюгацию mAb с p-SCN-Bn-дефероксамином с получением коньюгатов DFO-mAb; и (3) UFDF после коньюгации для удаления остаточных солей обеспечивала подходящую концентрацию, уровень вспомогательных средств и pH коньюгированного моноклонального антитела. Полученные коньюгаты DFO-mAb затем обеспечивали в забуференном состоянии с улучшенной стабильностью для последующего составления.

## (1) Ультрафильтрация и диафильтрация (UFDF) предварительной конъюгации

[0222] Для 100 г антитела против PD-L1 заменяли буфер на 5 мМ раствор ацетатного буфера, имеющий pH 5,50, с использованием мембранны Sius Prostream (TangenX Technology Corporation) (емкость мембранны  $\leq 500$  г/м<sup>2</sup>) для удаления остаточных солей перед конъюгацией. Объем процесса уменьшали, чтобы дополнительно сконцентрировать антитело, затем антитело стерильно фильтровали с использованием мембранны Sartopore 2 (Sartorius), имеющей размер пор 0,45/0,2 мкм (гетерогенный двойной слой PES) или эквивалентный размер пор. Температуру ацетатного буфера поддерживали при целевой температуре  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ . Растворы хорошо перемешивали.

## (2) Конъюгация

[0223] Концентрированное и отфильтрованное антитело (20 г) переносили в сосуд для конъюгации, содержащий систему карбонатного буфера без амина (56 мМ карбонат, 167 мМ хлорид натрия, pH 9,40), что приводило к незначительным уровням остаточного ацетата. DFO (25 мМ p-SCN-Bn-дефероксамин) солюбилизировали в DMSO и добавляли в сосуд для конъюгации вместе с дополнительным DMSO, так что DMSO присутствовал в конечном количестве 5%. DFO добавляли в молярном избытке при отношении DFO к mAb 4,5:1. Суммарный реакционный объем составлял 2,0 л. Буферную систему смешивали на протяжении добавления ингредиентов реакции и в течение всего времени реакции.

[0224] Температуру реакции контролировали в течение определенного времени с использованием уравнения, которое связывает температуру с временем реакции. В этом случае температуру реакции поддерживали при  $18^\circ\text{C}$  в течение 120 минут. Реакцию гасили добавлением 2 М уксусной кислоты (23 мл/л), в результате чего pH раствора составляла 6.

## (3) UFDF после конъюгации

[0225] После стадии конъюгации погашенный раствор для конъюгации DFO-mAb подвергали буферному обмену на гистидиновый буфер (10 мМ гистидин, pH 5,50, с добавлением суперрафинированного полисорбата 80 0,0005% (масса/объем) в качестве защитного средства от сдвига) для удаления остаточных солей процесса, DMSO и не прореагировавшего DFO. После диафильтрации раствор концентрировали, а затем составляли. Гистидиновый буфер выбирали для длительного хранения белка при  $-80^\circ\text{C}$ . Ту же самую мембранны Sius Prostream, упоминаемую в стадии (1), использовали в последней стадии UFDF. Полученный концентрированный раствор конъюгата DFO-mAb

стерильно фильтровали с использованием фильтра Sartopore 2, упомянутого выше.

[0226] UV-DAR (цель 1,5) и определение концентрации белка выполняли, как описывается в примере 2.

**Таблица 17. Молярные коэффициенты экстинкции и молекулярная масса**

Антитело	MW (г моль <sup>-1</sup> )	ε280 (л г <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup> )	ε252 (л г <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup> )
H4H8314N	144984	211480	80172

**Пример 9. Прогнозируемое воздействие радиоактивности на целый организм и ткани у субъектов-людей, получающих IV дозу конъюгата <sup>89</sup>Zr-DFO-антитело против PD-L1**

[0227] Цель следующего эксперимента состояла в том, чтобы оценить прогнозируемое облучение всего организма и тканей у субъектов-людей внутривенной (IV) дозой конъюгата <sup>89</sup>Zr-DFO-антитело против PD-L1. Примером антитела против PD-L1, использованного в меченном радиоактивной меткой конъюгате, было H4H8314N.

#### **Характеристика радиоиммуноконъюгатов**

[0228] Иммуноконъюгат антитела против PD-L1 (DFO-Ab) и иммуноконъюгат контрольного изотипа (контрольного DFO-IgG4<sup>P</sup>) метили радиоактивной меткой и очищали для применения в *in vivo* визуализации и исследованиях биораспределения. Анализ SEC-HPLC и *in vitro* анализ на основе клеток MC38/mPD-L1<sup>+/+</sup>/hPD-L1 (мышиных клеток аденокарциномы толстой кишки MC38, сконструированных для нокаута по PD-L1 мыши и стабильной экспрессии PD-L1 человека) проводили для характеристики полученных радиоиммуноконъюгатов.

#### *Мономерная и радиохимическая чистота*

[0229] Для оценки мономерной и радиохимической чистоты проводили SEC-HPLC с использованием детекторов UV- и γ-эмиссии. Результаты для радиоиммуноконъюгатных препаратов конъюгата <sup>89</sup>Zr-DFO-антитело против PD-L1 и радиоиммуноконъюгата <sup>89</sup>Zr-DFO-IgG4<sup>P</sup> контрольного изотипа показаны на фиг. 8.

[0230] Анализ хроматограмм поглощения при 280 нм проводили для оценки относительных количеств высокомолекулярного (HMW) и мономерного белка в радиоиммуноконъюгатных препаратах. Как показано в таблице 18, мономерные пики (считывание мономерной чистоты) составляют 99,6, 99,2 и 98,6%, соответственно, от

суммарной площади пиков белка для препаратов конъюгата  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 и  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG4<sup>P</sup> контрольного изотипа; также выявляли низкие уровни HMW соединений (0,4, 0,8 и 1,4%, соответственно). Низкомолекулярные (LMW) соединения не наблюдали ни для одного из тестируемых образцов.

**[0231]** Анализ радиохроматограмм для  $\gamma$ -эмиссии проводили для оценки относительных количеств  $^{89}\text{Zr}$ , включенных в радиоиммуноконъюгаты, по сравнению с невключенным  $^{89}\text{Zr}$  (таким как свободный  $^{89}\text{Zr}$  или  $^{89}\text{Zr}$ , хелатированный свободными DFO-производными). Как кратко описано в таблице 18, пики для невключенного  $^{89}\text{Zr}$  составляют  $\leq 1,1\%$  от суммарной площади пиков  $\gamma$ -эмиссии, в то время как объединенные пики для меченый радиоактивной меткой мономерных и HMW соединений (считывание радиохимической чистоты) составляют 98,9, 99,5 и 99,5%, соответственно, от суммарной площади пиков  $\gamma$ -эмиссии для препаратов конъюгата  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 и  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG4<sup>P</sup> контрольного изотипа.

**Таблица 18. Краткое описание данных SEC-HPLC**

Номер пика	Соединение	Приблизительное время удерживания (минуты)	Площадь пика (%)	
			UV-хроматограмма	Радиохроматограмма
<b>Исследование 1 <math>^{89}\text{Zr}</math>-DFO-H4H8314N</b>				
1	HMW	13	0,4	1,1
2	Мономер	16	99,6	97,8
3	Невключенный $^{89}\text{Zr}$	26	нет данных	1,1
<b>Исследование 2 <math>^{89}\text{Zr}</math>-DFO-H4H8314N</b>				
1	HMW	14	0,8	1,3
2	Мономер	16	99,2	98,2
3	Невключенный $^{89}\text{Zr}$	26	нет данных	0,5
<b>Контрольный <math>^{89}\text{Zr}</math>-DFO-IgG4<sup>P</sup></b>				
1	HMW	13	1,4	1,5
2	Мономер	16	98,6	98,0
3	Невключенный $^{89}\text{Zr}$	26	нет данных	0,5

Числовые значения для анализа SEC-HPLC графически представлены на фиг. 8.

UV-хроматограмма представляет собой хроматограмму поглощения при 280 нм, а радиохроматограмма представляет собой хроматограмму интенсивности  $\gamma$ -эмиссии. HMW: высокомолекулярный; нет данных: не определяется.

#### *Иммунореактивность*

**[0232]** Иммунореактивность, меру процента меченого радиоактивной меткой

конъюгированного антитела, способного связывать его антиген, определяли путем инкубации конъюгата  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 с клетками MC38/mPD-L1 $^{+/+}$ /hPD-L1. 2 тестируемые партии конъюгата  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 продемонстрировали иммунореактивность 84,5 и 88,8% на клетках MC38/mPD-L1 $^{+/+}$ /hPD-L1 (таблица 19). Фоновую неспецифическую иммунореактивность 8,8% наблюдали для радиоиммуноконъюгата контрольного изотипа.

**Таблица 19. Иммунореактивность меченного  $^{89}\text{Zr}$  конъюгата DFO-антитело против PD-L1 и  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG4 $^P$  контрольного изотипа**

Радиоиммуноконъюгат	Иммунореактивность
конъюгат $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 (партия 1)	84,5%
конъюгат $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 (партия 2)	88,8%
$^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG4 $^P$ контрольного изотипа	8,8%

[0233] В заключение, две отдельные партии конъюгата  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 показали высокую иммунореактивность, процентное содержание мономера и радиохимическую чистоту.

#### **Биораспределение $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитела против PD-L1 у мышей**

[0234] В этом эксперименте оценивали биораспределение радиоиммуноконъюгата антитела PD-L1 человека, конъюгата  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1, с течением времени после введения одной внутривенной (IV) дозы 50 мКи (1 мг/кг) PD-L1/PD-1-гуманизированным мышам (*PD-1hu/huPD-L1hu/hu*). Поскольку H4H8314N не связывает PD-L1 мыши, часть мышного гена *PD-L1*, кодирующего эктодомен PD-L1, заменили соответствующей человеческой последовательностью у мышей *PD-1hu/hu-PD-L1hu/hu*. В этом штамме эктодомен PD-1 мыши аналогичным образом гуманизирован. Эти мыши не подвергались иммуно/воспалительной провокации, и, поэтому, ожидается, что они будут иметь нестимулированные уровни экспрессии PD-L1 в иммунных клетках. Две группы по 8 животных в каждой умерщвляли через 6 дней (144 часа) или 10 дней (240 часов) после введения дозы, собирали кровь и собирали следующие ткани: сердце, легкие, печень, селезенку, почки, желудок, тонкий кишечник, слепую кишку, толстый кишечник, кость (бедренную), тимус, мышцу, мочевой пузырь и головной мозг. Процентное содержание радиоактивности в суммарной введенной инъекцией дозе (% ID), локализованной в определенных тканях или крови, определяли и указывали как среднее значение % ID на грамм (% ID/г) ткани. Перед умерщвлением получали изображения иммуно-ПЭТ/компьютерной томографии (КТ) через 1, 24, 48, 72, 144, 192 (только для 10-дневной

группы) и 240 (только для 10-дневной группы) часов после введения дозы от тех же животных.

**[0235]** Относительно уровней  $^{89}\text{Zr}$  в крови поглощение конъюгата  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 в определенных тканях было незначительным в течение 10-дневного периода исследования, что оценивали с помощью анализа ткани *ex vivo* (таблица 20 и фиг. 9) и визуализации *in vivo*. По сравнению с кровью ( $9,4 \pm 2,2\% \text{ ID/g}$ ) все собранные ткани, за исключением селезенки, демонстрировали более низкие уровни  $^{89}\text{Zr}$  ( $\leq 6,7\% \text{ ID/g}$ ) на день 6 после введения дозы. Небольшая степень опосредованного мишенью поглощения конъюгата  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 ( $10,2 \pm 1,9\% \text{ ID/g}$ ) наблюдали в селезенке, в соответствии с экспрессией PD-L1 в спленоцитах, что было продемонстрировано с помощью проточной цитометрии. Через 10 дней после введения дозы уровни  $^{89}\text{Zr}$  в крови снижались в 7,8 раза по сравнению с днем 6 после введения дозы, что указывает на ответ антитела человека против антитела мыши (МАНА), влияющий на уровни конъюгата  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1. Этот наблюдаемый ответ МАНА, вероятно, связан с тем фактом, что цель, PD-L1, экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках (Francisco, 2010), что приводит к презентации антитела человека иммунной системе мыши и последующему образованию МАНА. Параллельно уровни  $^{89}\text{Zr}$  в печени были повышены в 4,1 раза на день 10 по сравнению с днем 6 после введения дозы, вероятно, в результате образования иммунного комплекса (IC) МАНА конъюгат  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 и последующего опосредованного печенью клиренса IC (Rojko, 2014). ПЭТ визуализация *in vivo* всего животного не выявила заметного тканеспецифического поглощения конъюгата  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 за пределами низкого сигнала для селезенки и МАНА-опосредованного накопления в печени, описанного выше.

**[0236]** Таким образом, отмеченное опосредованное мишенью поглощение конъюгата  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 в определенных тканях выше уровней  $^{89}\text{Zr}$  в крови не наблюдали в течение 6-дневного периода у PD-L1/PD-1-гуманизированных мышей, которым вводили однократную IV дозу 1 мг/кг (50 мКи) конъюгата  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1, за исключением селезенки, где наблюдали небольшую степень опосредованного мишенью поглощения в соответствии с продемонстрированной экспрессией PD-L1 в спленоцитах. На данные, собранные после дня 6 и до конца исследования в день 10 после введения дозы, влиял ответ МАНА.

**Таблица 20. Среднее значение данных биораспределения *ex vivo***

Ткань	Уровни <sup>89</sup> Zr в день после введения дозы (% ID/г)		Уровни <sup>89</sup> Zr в день после введения дозы (% ID/г)		10
	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	
Кровь	9,4	2,2	1,2	1,4	
Сердце	3,1	0,6	1,2	0,4	
Легкие	5,9	0,7	2,6	0,7	
Печень	4,9	1,9	20,2	7,8	
Селезенка	10,2	1,9	12,1	3,0	
Почки	5,3	1,1	3,9	1,3	
Желудок	0,9	0,3	0,4	0,1	
Тонкий кишечник	1,5	0,3	0,9	0,1	
Слепая кишка	1,0	0,2	0,6	0,2	
Толстый	1,4	0,3	0,7	0,2	
Кость (бедренная)	6,3	2,1	6,9	1,4	
Тимус	6,7	1,6	5,3	1,1	
Мышца	0,9	0,1	0,5	0,1	
Мочевой пузырь	4,3	2,1	1,7	0,9	
Головной мозг	0,4	0,1	0,2	0,1	

Сокращение: % ID/г = процент вводимой инъекцией дозы на грамм (ткани).

#### **Оценки воздействия радиоактивности на весь организм и ткани у людей**

**[0237]** В этом эксперименте использовали данные ПЭТ/КТ-изображений четырех самцов PD-1/PD-L1-гуманизированных мышей и четырех самок PD-1/PD-L1-гуманизированных мышей, визуализированных через 1, 24, 48, 72, 144, 192 и 240 часов после однократной IV дозы 50 мКи (1 мг/кг) конъюгата <sup>89</sup>Zr-DFO-антитело против PD-L1. Данные, полученные при введении этой клинически значимой дозы, использовали при расчете оценок воздействия радиоактивности на человека. Данные о концентрации в тканях определяли с использованием анализа исследуемого объема (VOI).

**[0238]** Для оценки радиационной дозиметрии среднее время пребывания определяли для следующих участков: головной мозг, содержимое желудка, содержимое сердца, почки, печень, легкие, мышца, красный костный мозг, селезенка, содержимое мочевого пузыря и остальные части организма. Эти средние значения времени пребывания использовали в качестве входных данных в программном обеспечении OLINDA EXM 1.1 для оценки средних поглощенных тканью доз и эффективной дозы у людей.

**[0239]** Эффективную для человека дозу конъюгата <sup>89</sup>Zr-DFO-антитело против PD-

L1 оценивали как 0,513 мЗв/МБк (миллизиверт/мегабеккерель) у взрослого мужчины и 0,622 мЗв/МБк у взрослой женщины. Органами, которые, как прогнозировали, имели самую высокую поглощенную дозу у людей, были селезенка и печень. Расчетная поглощенная доза в селезенке составляла 0,856 мЗв/МБк у взрослого мужчины и 1,12 мЗв/МБк у взрослой женщины. Расчетная поглощенная доза в печени составила 0,764 мЗв/МБк у взрослого мужчины и 0,974 мЗв/МБк у взрослой женщины.

**[0240]** Среднее значение скорректированного на распад процента вводимой инъекцией дозы на мл (DC % ID/мл) для мышей мужского и женского пола (n = 4 самца, n = 4 самки) для каждого VOI приведен в таблице 21.

**Таблица 21. Данные биораспределения**

		Среднее значение скорректированного на распад процента вводимой инъекцией дозы на мл (DC % ID/мл) (DC %ID/mL) ± SD									
Время (часы)	1	24		48		72		144			
Пол	Женск ий	Мужск ой	Женск ий	Мужск ой	Женск ий	Мужск ой	Женск ий	Мужск ой	Женск ий	Мужск ой	
Головной мозг	1,365 ± 0,115	1,190 ± 0,050	0,903 ± 0,115	0,538 ± 0,071	0,640 ± 0,079	0,548 ± 0,218	0,685 ± 0,096	0,623 ± 0,224	0,465 ± 0,231	0,398 ± 0,073	
Легкие	12,503 ± 1,146	12,498 ± 0,414	8,293 ± 0,635	7,155 ± 1,175	6,715 ± 0,370	5,888 ± 0,990	6,060 ± 0,708	5,558 ± 0,385	4,863 ± 0,316	4,585 ± 0,339	
Печень	12,298 ± 0,664	12,078 ± 0,372	9,058 ± 0,793	7,200 ± 0,499	8,113 ± 0,969	6,125 ± 0,858	7,838 ± 0,932	6,203 ± 0,483	9,423 ± 1,885	6,208 ± 1,428	
Сердце	27,688 ± 1,942	25,695 ± 0,934	15,685 ± 1,223	13,323 ± 1,133	12,088 ± 0,883	10,25 ± 1,335	11,740 ± 1,553	9,915 ± 0,171	8,140 ± 0,598	7,463 ± 0,768	
Почки	11,430 ± 0,387	12,100 ± 0,872	7,345 ± 0,322	6,783 ± 0,811	6,418 ± 0,761	5,565 ± 0,680	6,475 ± 0,493	5,568 ± 0,550	5,643 ± 0,222	4,815 ± 0,450	
Селезенка	15,263 ± 2,166	15,860 ± 0,974	14,135 ± 2,010	11,265 ± 1,706	13,675 ± 2,195	9,388 ± 1,389	13,655 ± 3,606	9,920 ± 1,414	15,105 ± 2,959	10,303 ± 1,102	
Мочевой пузырь	6,045 ± 3,910	9,688 ± 4,991	1,653 ± 0,107	1,820 ± 0,283	1,443 ± 0,205	1,403 ± 0,160	1,318 ± 0,108	1,710 ± 0,346	1,115 ± 0,224	1,293 ± 0,430	
Мышца	1,608 ± 0,182	1,435 ± 0,198	2,608 ± 0,196	1,780 ± 0,137	2,368 ± 0,259	1,955 ± 0,339	2,408 ± 0,181	2,148 ± 0,176	2,095 ± 0,168	1,918 ± 0,144	
Желудок	3,238 ± 1,063	3,978 ± 0,632	2,875 ± 0,921	3,073 ± 0,566	2,478 ± 0,296	2,238 ± 0,487	2,260 ± 0,306	2,233 ± 0,491	2,380 ± 0,405	1,665 ± 0,148	

Кость	$3,683 \pm 1,418$	$3,023 \pm 0,244$	$3,310 \pm 0,330$	$2,738 \pm 0,171$	$4,600 \pm 0,511$	$3,493 \pm 0,716$	$4,850 \pm 1,292$	$4,658 \pm 1,399$	$8,993 \pm 1,057$	$7,635 \pm 0,872$
-------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------

[0241] Оцениваемые значения среднего времени пребывания (MRT) в человеке представлены в таблице 22 для каждого из органов-источников. MRT в остальных частях организма получали путем вычитания суммы всех значений времени пребывания в органе-источнике из обратной величины константы распада  $^{89}\text{Zr}$  (Huang et al., Biodistribution, toxicity and radiation dosimetry studies of the serotonin transporter radioligand 4-[18F]-ADAM in rats and monkeys. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2010; 37: 545-555). Это является консервативной оценкой кумулятивной радиоактивности тканей.

**Таблица 22. Среднее время пребывания (часы) в человеке**

<b>Орган/Ткань</b>	<b>Физический распад<sup>1</sup></b>		<b>Биэкспоненциальная подгонка<sup>2</sup></b>	
	<b>Женский пол</b>	<b>Мужской пол</b>	<b>Женский пол</b>	<b>Мужской пол</b>
Головной мозг	0,398	0,364	0,372	0,344
Содержимое желудка	0,511	0,476	0,492	0,480
Содержимое сердца	2,433	2,279	2,290	2,154
Почки	0,868	0,818	0,832	0,794
Печень	5,902	5,919	8,240	5,938
Легкие	2,508	2,772	2,411	2,642
Мышцы	17,635	23,677	13,348	17,182
Красный костный мозг	2,777	2,024	2,613	1,913
Селезенка	0,996	0,871	1,053	0,910
Содержимое мочевого пузыря	0,299	0,491	0,315	0,405
Остальные части организма	78,794	73,430	81,157	80,361

<sup>1</sup> Среднее время пребывания рассчитывали, исходя только из физического распада после момента времени - дня 6.

<sup>2</sup> Среднее время пребывания, рассчитывали по биэкспоненциальному подгонке данных.

[0242] Оцениваемые поглощенные тканью дозы для всех целевых органов для моделирующих объектов взрослых мужчин и взрослых женщин согласно OLINDA/EXM 1.1 представлены в таблице 23. Эффективная доза, определенная Международной комиссией по радиологической защите (ICRP) (International Commission on Radiological Protection. 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 60, Pergamon Press, New York, 1991), представляет собой величину,

которую рассчитывают путем умножения поглощенной дозы для данного органа на весовой коэффициент стохастического риска и сложения всех взвешенных доз вместе. Оцениваемые эффективные дозы приведены в конце таблицы 23. Эти значения представляют собой консервативную оценку поглощенных радиоактивных доз.

**Таблица 23 Оцениваемые поглощенные человеческой тканью дозы и эффективная доза**

<b>Орган/Ткань</b>	<b>Физический распад<sup>1</sup></b>		<b>Биэкспоненциальная подгонка<sup>2</sup></b>	
	<b>Взрослый мужчина (мЗв/МБк)</b>	<b>Взрослая женщина (мЗв/МБк)</b>	<b>Взрослый мужчина (мЗв/МБк)</b>	<b>Взрослая женщина (мЗв/МБк)</b>
Надпочечники	0,561	0,702	0,567	0,726
Головной мозг	0,179	0,237	0,182	0,234
Молочные железы	0,366	0,459	0,379	0,466
Стенка желчного пузыря	0,601	0,692	0,610	0,751
Стенка LLI	0,519	0,652	0,530	0,651
Тонкий кишечник	0,563	0,600	0,582	0,605
Стенка желудка	0,575	0,714	0,584	0,718
Стенка ULI	0,553	0,685	0,571	0,700
Стенка сердца	0,789	0,973	0,781	0,964
Почка	0,650	0,773	0,641	0,774
Печень	0,764	0,974	0,764	1,220
Легкие	0,575	0,705	0,561	0,700
Мышца	0,396	0,481	0,381	0,464
Яичники	0,533	0,645	0,542	0,642
Поджелудочная железа	0,597	0,743	0,606	0,765
Красный костный мозг	0,480	0,591	0,483	0,587
Остеогенные клетки	0,604	0,777	0,625	0,779
Кожа	0,291	0,373	0,297	0,374
Селезенка	0,856	1,120	0,876	1,160
Яички	0,399	NA	0,407	NA
Тимус	0,481	0,605	0,484	0,601
Щитовидная железа	0,417	0,484	0,423	0,480
Стенка мочевого пузыря	0,580	0,496	0,559	0,494
Матка	0,545	0,638	0,554	0,636
Весь организм	0,440	0,550	0,440	0,554
<b>Эффективная доза</b>	<b>0,513</b>	<b>0,622</b>	<b>0,516</b>	<b>0,625</b>

<sup>1</sup> Поглощенные дозы, рассчитанные по МРТ, предполагающие только физический распад после момента времени - дня 6.

<sup>2</sup> Поглощенные дозы, рассчитанные по МРТ с биэкспоненциальной подгонкой данных.

Сокращения: LLI = нижний отдел толстого кишечника, ULI = верхний отдел толстого кишечника, нет данных = не определяли.

**[0243]** Оцениваемые поглощенные тканями человека дозы и эффективная доза для человека (таблица 23) по физическому распаду и способам биэкспоненциальной подгонки были подобными. Способ физического распада выбирали для получения конечного набора оцениваемых поглощенных человеческой тканью доз и эффективной дозы из-за явного ответа МАНА в данной мышиной модели. Следовательно, эффективную дозу для человека для конъюгата <sup>89</sup>Zr-DFO-антитело против PD-L1 оценивали как 0,513 мЗв/МБк у взрослого мужчины и 0,622 мЗв/МБк у взрослой женщины. Органами, которые, как прогнозировали, имеют самую высокую поглощенную дозу у людей, являются селезенка и печень. Оцениваемая поглощенная доза в селезенке составляла 0,856 мЗв/МБк у взрослого мужчины и 1,12 мЗв/МБк у взрослой женщины. Оцениваемая поглощенная доза в печени составляла 0,764 мЗв/МБк у взрослого мужчины и 0,974 мЗв/МБк у взрослой женщины.

#### **Пример 10: Иммуно-ПЭТ визуализация PD-L1 в опухолях с использованием конъюгата <sup>89</sup>Zr-DFO-антитело против PD-L1 у больных с запущенными злокачественными новообразованиями грудной клетки**

**[0244]** Основной целью данного исследования является определение безопасности и переносимости конъюгата <sup>89</sup>Zr-DFO-антитело против PD-L1, в котором антитело против PD-L1, используемое в меченном радиоактивной меткой конъюгате, представляет собой H4H8314N. Второстепенными целями исследования являются:

- **только часть А исследования:** установление подходящей массовой дозы конъюгата <sup>89</sup>Zr-DFO-антитело против PD-L1 и оптимального времени визуализации после инфузии, оцениваемых с помощью визуализации и забора крови после инфузии меченого вещества;
- **только часть В исследования:** установление надежности теста/повторного теста в отношении измерений ПЭТ, оцениваемых по двум отдельным инфузиям меченого вещества при оптимальной массовой дозе и моменте времени визуализации, как определено в части А;
- характеристика фармакокинетического (PK) профиля конъюгата

$^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 на основании концентрации активности меченого вещества в плазме.

**[0245]** Это открытое исследование, состоящее из 2 частей, предназначенное для оценки безопасности и переносимости  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1. В части А исследования будет установлена подходящая массовая доза, доза активности  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 и оптимальное время визуализации после инфузии. Вариабельность теста/повторного теста  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 будет оцениваться в части В.

**[0246]** Все больные будут проходить процедуры скрининга. Больные, которые отвечают критериям приемлемости, будут подвергнуты ПЭТ с помощью  $^{18}\text{F}$ -фтордезоксиглюкозы ( $^{18}\text{F}$ -FDG)/компьютерной томографии (КТ) и диагностическим КТ-сканирования для оценки жизнеспособности, локализации и размеров поражения. Эти сканирования не потребуются, если доступны изображения подходящего качества, полученные в течение 28 дней после предполагаемой первой дозы  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1.

## Часть А

**[0247]** Планируют, что три получающие последовательные дозы когорты будут лечиться открытым способом с помощью  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 при 5 мг, 10 мг или 20 мг.

**[0248]** После инфузии  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 больные будут подвергаться ПЭТ/КТ-сканированиям в отношении  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 в день 1, день  $4 \pm 1$  и день  $7 \pm 1$ . Дополнительная визуализация может быть выполнена до 10 дня. Больные будут подвергаться оценкам безопасности и предоставлять образцы для гематологических, химических анализов, анализов иммунной безопасности, фармакокинетических показателей, анализа антител против лекарственного средства и анализа биомаркеров.

**[0249]** Больные будут продолжать проходить оценки безопасности, в том числе физическое обследование, показателей жизненно важных функций и документирование побочных эффектов (AE), вплоть до дня 21 после инфузии меченого вещества  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1.

**[0250]** Решения об увеличении дозы для определения подходящей дозы будут основываться на данных о безопасности и переносимости и оценке позитивности иммuno-позитронной эмиссионной томографии (iPET) и концентрации активности меченого вещества в плазме, как описано ниже.

### **Получающие дозу когорты в части А**

**[0251]** Планируют до 3 получающих возрастающую массовую дозу когорт. Каждая получающая массовую дозу когорта будет получать дозу с минимальным 48-часовым интервалом между введениями дозы у каждого больного. По завершении ПЭТ/КТ-сканирования в день  $7 \pm 1$  день для второго больного при данной массовой дозе будут рассмотрены все доступные данные визуализации, концентрация активности меченого вещества в плазме, клинической дозиметрии и безопасности. На основании этого обзора будет принято решение о:

- расширении когорты из 6 больных, если есть положительный результат в отношении поглощения опухолью/опухолевой локализации по меньшей мере у 1 больного, как определено отношением опухоли к крови  $> 1$ ;
- переходе к следующей получающей массовую дозу когорте, если имеется неподходящее поглощение опухолью и концентрация активности меченого вещества в плазме, с подходящим, определяемым с помощью стандартизированной величиной поглощения в крови (SUV) диапазоном от 1 до 5 в оптимальный момент времени визуализации;
- переходе к следующей получающей массовую дозу когорте с более низкой массовой дозой на основании недостаточного поглощении опухолью и подходящей концентрации активности меченого вещества в плазме.

**[0252]** Если опухолевая локализация является неподходящей по меньшей мере у 2 больных при всех трех предложенных уровнях массовой дозы, и определено, что это происходит из-за низкого отношения сигнал-шум в изображении, доза активности будет увеличена максимум до 185 МБк для дальнейшего расширения ранее тестируемых получавших массовую дозу когорт.

### **Часть В**

**[0253]** Часть В исследования начнется после того, как в части А будет определена подходящая доза  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 и оптимальное время визуализации. В день 1 части В больные будут получать массовую дозу меченого вещества. После получения меченого вещества больные будут проходить сканирование в оптимальное время, определяемое в части А. Больные в части В будут получать вторую дозу меченого вещества и пройдут сканирование после интервала между дозами от 14 до 28 дней. Фактические сроки введения второй дозы меченого вещества после интервала будут определены на основании результатов, полученных в части А.

**[0254]** Больные будут подвергаться оценкам безопасности, включающим в себя

физическое обследование, показатели жизненно важных функций и документирование нежелательных явлений (AE) во время и после визитов, при которых вводят меченое вещество  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1. Во время этих визитов больные будут предоставлять образцы для анализов РК, гематологии, химии и иммунной безопасности.

**[0255]** Как для части А, так и для части В больные продолжат проходить оценки безопасности, включающие в себя физическое обследование, показатели жизненно важных функций и документирование AE, вплоть до 21 дня после последней инфузии меченого вещества  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1.

### **Продолжительность исследования**

**[0256]** Для части А: больные будут подвергаться периоду скрининга до 28 дней (4 недели) и периоду последующего наблюдения до 21 дня (приблизительно 3 недели) после инфузии дозы меченого вещества. Продолжительность части А исследования составит приблизительно 7 недель, включая период скрининга.

**[0257]** Для части В: больные будут подвергаться периоду скрининга до 28 дней (4 недели) с интервалом между инфузиями до 28 дней (4 недели) и 21-дневному (3 недели) периоду последующей оценки безопасности, который включает в себя второй период сканирования. Суммарная продолжительность исследования для каждого больного будет составлять до 11 недель, включая период скрининга.

**[0258]** Конец исследования для данного исследования определяют как последний визит последнего пациента.

**[0259]** Для части А исследования планируют 3 уровня последовательных доз до 6 больных на когорту, с запланированными 3 когортами, всего до 18 больных. Для части В исследования будут включены до 10 больных. Для всего исследования планируют включение в исследование максимум 28 больных в одном участке исследования.

### **Целевая популяция больных**

**[0260]** Целевая популяция будет состоять из больных возрастом 18 лет и старше с прогрессирующими злокачественными новообразованиями грудной клетки и баллом IHC PD-L1 при диагностической или последующей биопсии  $\geq 1\%$  (положительный балл IHC PD-L1 по анализу 22C3 PharmDx, Dako North America Inc.).

- Для части А злокачественные новообразования грудной клетки будут ограничены до NSCLC, аденокарциномы желудочно-пищеводного перехода и рака желудка, с баллом PD-L1  $\geq 1\%$  по IHC.

- Для части В будут допущены все больные с прогрессирующими злокачественными новообразованиями грудной клетки и баллом PD-L1  $\geq 1\%$  по ИНС. Больные также должны иметь стабильное заболевание в соответствии с RECIST 1.1 между двумя последними исследованиями с помощью визуализации.

**[0261]** Все нуждающиеся в терапии больные должны проходить стандартную терапию.

### Лечение

**[0262]**  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 представляет собой радиоиммуноконъюгат, образованный путем ковалентного конъюгирования бифункционального хелатора (p-SCN-Bn-DFO) с H4H8314N (моноклональным антителом против PD-L1) и мечения радиоактивной меткой  $^{89}\text{Zr}$  этого соединения.  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 поставляют в водном буферном носителе.

**[0263]** Для части А  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 будут вводить IV в день 1 (исходный уровень). Для части В  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 будут вводить IV в день 1 и день  $7 \pm 3$ . Фактические сроки второй дозы в части В будут определять по результатам в части А.

**[0264]** Меченое вещество -  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 - будут вводить с уровнем дозы, значительно ниже предполагаемых кумулятивных уровней воздействия на людей на основании моделей PK, и ниже, чем уровни, при которых на данный момент имеющиеся средства на основе антител против PD-1 используют для лечения злокачественных опухолей. Данное исследование исключит больных, которых на данный момент лечат антителом против PD-L1, чтобы избежать конкуренции за цель.

### Конечные точки

**[0265]** Первой конечной точкой в исследовании является частота и тяжесть возникающих при лечении нежелательных явлений (TEAE) до дня 21 после последней дозы инфузии меченого вещества у больных со злокачественными новообразованиями грудной клетки, которым вводили дозу  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1.

**[0266]** Только для части А: исследование установит подходящую массовую дозу и дозу активности  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1, а также оптимальное время визуализации после инфузии, и с помощью забора крови и визуализации в день 1, 4 и 7 после инфузии меченого вещества будут определять следующее:

- стандартизированное значение поглощения  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-антитело против PD-L1 в пуле крови с последующим расчетом соотношений опухоли к крови во время визуализации;

- стандартизированные значения поглощения (SUV) по исследуемым участкам опухоли (ROI);
- максимальные SUV (SUV<sub>max</sub>) с ROI опухоли;
- концентрацию активности меченого вещества в плазме, выраженную в виде SUV, с расчетом площади под кривой до дня 7 (AUC<sub>0-7</sub>).

**[0267]** Только для части В: исследование установит достоверность теста/повторного теста в отношении измерений ПЭТ <sup>89</sup>Zr-DFO-антитело против PD-L1, и из измерений 2 отдельных инфузий меченого вещества при подходящей массовой дозе и оптимальных моментов времени визуализации, определенных из части А, будут определять следующее:

- SUV пула крови с последующим расчетом соотношения опухоли к крови;
- SUV по ROI опухоли;
- SUV<sub>max</sub> в ROI опухоли;
- биораспределение <sup>89</sup>Zr-DFO-антитело против PD-L1.

**[0268]** Полученные данные будут показывать безопасность и переносимость <sup>89</sup>Zr-DFO-антитело против PD-L1 у людей.

**[0269]** Варианты осуществления и примеры, описанные выше, предназначены исключительно для иллюстрации и не являются ограничивающими. Специалисты в данной области техники узнают или смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, многочисленные эквиваленты конкретных соединений, материалов и процедур. Все такие эквиваленты считаются попадающими в объем прилагаемой формулой изобретения и охватываются ею.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Регенерон Фармацевтикалс, Инк.  
Келли Маркус  
Ма Дангше  
Олсон Виллиам  
Турстон Гевин

<120> МЕЧЕННЫЕ РАДИОАКТИВНОЙ МЕТКОЙ АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-L1 ДЛЯ ИММУНО-ПЭТ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

<130> 10305W001

<140> TBD  
<141> 2017-12-01

<160> 344

<170> Патентная версия 3.5

<210> 1  
<211> 363  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 1  
gaggtgcagc tggtgaggc tgggggaggc ttggccagc ctggggggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt caccttagt aggtttgga tgagctgggt ccgccaggct 120  
ccagggaaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaaccaag atggaactga gaaatactat 180  
gtggactctg tgaaggcccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaaa ctcactgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgag agccggggac acggctgtgt attactgtgc gaatacgtat 300  
tacgattttt ggagtggtaa ctttgactac tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc 360  
tca 363

<210> 2  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 2

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

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

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

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

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

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

Ala Asn Thr Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly His Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 3  
ggattcacct ttagtaggtt ttgg 24

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Phe Trp  
1 5

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 5  
ataaaaccaag atggaactga gaaa 24

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 6

Ile Asn Gln Asp Gly Thr Glu Lys  
1 5

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 7  
gcgaatacgt attacgattt ttggagtggt cacttgact ac 42

<210> 8  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 8

Ala Asn Thr Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly His Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 9  
<211> 321  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 9  
gacatccaga tgacctcagg tccttcacc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgtc gggccagtca gagtattagt aattgggtgg cctggtatca gcagaaacca 120  
gggaaaagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagcg gcagtggatc tggcacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tatcatagtt attcgtacac ttttggccag 300  
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 10  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 10

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

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

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Ser Tyr  
85 90 95

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

<210> 11

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 11

cagagtatta gtaattgg

18

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 12

Gln Ser Ile Ser Asn Trp  
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223>	синтетическая	
<400>	13	
	aaggcgtct	9
<210>	14	
<211>	3	
<212>	PRT	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	14	
Lys Ala Ser		
1		
<210>	15	
<211>	27	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	15	
caacagttatc atagttattc gtacact		27
<210>	16	
<211>	9	
<212>	PRT	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	16	
Gln Gln Tyr His Ser Tyr Ser Tyr Thr		
1	5	
<210>	17	
<211>	363	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	17	
caggagcacc tggtgaggc tgggggaggc gtggccagc ctgggaggc cctgagactc		60
tcctgtgaag cgtctggatt caccttcagt aacttggca tgcactgggt ccgccaggct		120
ccaggcaagg ggctggaggc ggtggcagct ttatggctg atgaaatggaa taaataactat		180
gcagactccg tgaagggtcg agtccccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat		240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtct attactgtgc gagagggaga		300

ggagcccccg gtattccat tttgggtac tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc 360  
tca 363

<210> 18  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 18

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe  
20 25 30

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

Ala Ala Leu Trp Ser Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Arg Gly Ala Pro Gly Ile Pro Ile Phe Gly Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 19  
ggattcacct tcagtaactt tggc 24

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 20

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Gly  
1 5

<210> 21  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 21  
ttatggctcg atggaagtaa taaa

24

<210> 22  
<211> 8  
<212> РРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 22

Leu Trp Ser Asp Gly Ser Asn Lys  
1 5

<210> 23  
<211> 42  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 23  
gcgagaggga gaggagcccc cggttattccg atttttgggt ac

42

<210> 24  
<211> 14  
<212> РРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 24

Ala Arg Gly Arg Gly Ala Pro Gly Ile Pro Ile Phe Gly Tyr  
1 5 10

<210> 25  
<211> 321

<212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> синтетическая  
  
 <400> 25  
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttggaga cagagtcacc 60  
 atcaacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaaacca 120  
 gggaaaagccc ctaagcgccct gatctatact gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 agattcagcg gcagtggatc tggacagaa ttcaactctca caatcagcag cctacagcct 240  
 gaagattttg caacttatta ctgtctacaa cataatagtt accctctcac attcggcgga 300  
 gggaccaagg tggcgatcaa a 321

<210> 26  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> синтетическая  
  
 <400> 26

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Ala Ile Lys  
 100 105

<210> 27  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>

<223> синтетическая

<400> 27  
cagggcatta gaaatgat 18

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

<220>

<223> синтетическая

<400> 28

Gln Gly Ile Arg Asn Asp  
1 5

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

<220>

<223> синтетическая

<400> 29  
actgcattcc 9

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

<220>

<223> синтетическая

<400> 30

Thr Ala Ser  
1

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

<220>

<223> синтетическая

<400> 31  
ctacaacata atagttaccc tctcaca 27

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

<220>

<223> синтетическая

<400> 32

Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Leu Thr  
1 5

<210> 33

<211> 390

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 33

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctggggggtc ccttagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagga aaactgatgg tgggacaaca 180

gactacgctg cacccgtgaa aggagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaatacg 240

ctgcatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgttatta ctgtaccaca 300

gatgatattg tagttgtacc agctgttatg aggaaatact acttcggtat ggacgtctgg 360

ggccaaggga ccacggtcac cgctcctca 390

<210> 34

<211> 130

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 34

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

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

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

Gly Arg Ile Lys Arg Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala  
50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
65 70 75 80

Leu His Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Asp Asp Ile Val Val Val Pro Ala Val Met Arg Glu  
100 105 110

Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
115 120 125

Ser Ser  
130

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 35  
ggattcactt tcagtaacgc ctgg 24

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp  
1 5

<210> 37  
<211> 30  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 37  
attaaaagga aaactgatgg tgggacaaca 30

<210> 38  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 38

Ile Lys Arg Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr  
1 5 10

<210> 39  
 <211> 63  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 39  
 accacagatg atattgtagt tgtaccagct gttatgaggg aatactactt cggtatggac 60  
 gtc 63

<210> 40  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 40  
 Thr Thr Asp Asp Ile Val Val Val Pro Ala Val Met Arg Glu Tyr Tyr  
 1 5 10 15

Phe Gly Met Asp Val  
 20

<210> 41  
 <211> 321  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 41  
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc ggacaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagcgccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagcg gcagtggatc tggacagaa ttcaactctca caatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagatttg caacttatta ctgtctacag cataataatt acccgtacac ttttggccag 300  
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 42  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 42

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp  
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Asn Tyr Pro Tyr  
85 90 95

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

<210> 43

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 43

cagggcatta gaaatgat

18

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 44

Gln Gly Ile Arg Asn Asp

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 45  
gctgcattcc 9

<210> 46  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 46

Ala Ala Ser  
1

<210> 47  
<211> 27  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 47  
ctacagcata ataattaccc gtacact 27

<210> 48  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 48

Leu Gln His Asn Asn Tyr Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 49  
<211> 363  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 49  
caggtgcaat tggtgcatgc tggggcgagg gtgaagaagc ctggggcctc agtgcaggc 60  
tcctgcaagg cttctggata ctccttcacc ggctactata tacactgggt ggcacaggcc 120  
cctggacaag gacttgagtg gatggatgg atcaacccta acagtggcac caaaaagtat 180  
gcacacaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcga cacagcctac 240  
atgattttga gcagtctgat atccgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatgag 300  
gactggaact ttgggagctg gttcgactcc tggggccagg gaaccctgggt caccgtctcc 360

<210> 50  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 50

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Thr Lys Lys Tyr Ala His Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Glu Asp Trp Asn Phe Gly Ser Trp Phe Asp Ser Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 51  
ggatactcct tcaccggcta ctat

24

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

<220>

<223> синтетическая

<400> 52

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr  
1 5

<210> 53

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 53

atcaacccta acagtgccac caaa

24

<210> 54

<211> 8

<212> РРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 54

Ile Asn Pro Asn Ser Gly Thr Lys

1 5

<210> 55

<211> 42

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 55

gcgagagatg aggactggaa ctttgggagc tggttcgact cc

42

<210> 56

<211> 14

<212> РРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 56

Ala Arg Asp Glu Asp Trp Asn Phe Gly Ser Trp Phe Asp Ser  
1 5 10

<210> 57

<211> 336

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 57

gatatttgta tgacccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc	60
atctcctgca ggtcttagtca aaccctcgta cacggtgatg gaaacacgta cttgagttgg	120
attcagcaga ggccaggcca gcctccgaga ctcctcattt ataaggtttc taatcagttc	180
tctgggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc	240
agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggctt tatttctgca tgcaagctac acattttccg	300
atcaccttcg gccaagggac acgactggag attaaa	336

<210> 58

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 58

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

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

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Gln Phe Ser Gly Val Pro	
50	55
	60

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

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

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

<210> 59

<211> 33

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 59  
caaaccctcg tacacggta tggaaacacg tac 33

<210> 60  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 60

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

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 61  
aaggtttct 9

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 62

Lys Val Ser  
1

<210> 63  
<211> 27  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 63  
atgcaagcta cacatttcc gatcacc 27

<210> 64  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 64

Met Gln Ala Thr His Phe Pro Ile Thr  
1 5

<210> 65

<211> 363

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 65

caggtacacc tggtgcaagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggc 60

tcctgcaagg cttctggata cacccacc ggctactata tacattgggt ggcacaggcc 120

cctggacacg ggcttgagtg gatggatgg ctcaacccta atactggcac cacaaggat 180

atacagaact ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccagcag cacagcctac 240

atggagctga ccaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatgag 300

gactggaatt atgggagctg gttcgacacc tggggccagg gaaccctggg cacagtctcc 360

tca 363

<210> 66

<211> 121

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 66

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Glu Asp Trp Asn Tyr Gly Ser Trp Phe Asp Thr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 67  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 67  
ggatacacacct tcaccggcta ctat 24

<210> 68  
<211> 8  
<212> РРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 68

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr  
1 5

<210> 69  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 69  
ctcaacccta atactggtag caca 24

<210> 70  
<211> 8  
<212> РРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 70

Leu Asn Pro Asn Thr Gly Thr Thr  
1 5

<210> 71  
<211> 42  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 71  
gcgagagatg aggactggaa ttatgggagc tggttcgaca cc 42

<210> 72  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 72

Ala Arg Asp Glu Asp Trp Asn Tyr Gly Ser Trp Phe Asp Thr	
1	5
	10

<210> 73  
<211> 336  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 73  
gatattgtaa tgacccagac tccactctcc tcacacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60  
atctcctgca ggtcttagtcc aagcctcgta cacagtgtatg gaaacaccta cttgagttgg 120  
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctccataattt ataagatttc taaccgattc 180  
tctgggtcc cagacagatt cagtgccagt ggggcaggga cagatttcac gctgaaaatc 240  
agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggtt tattactgca tgcaagctac acattttccg 300  
atcaccttcg gccaagggac acgactggag attaga 336

<210> 74  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 74

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

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

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly 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 Ala  
85 90 95

Thr His Phe Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Arg  
100 105 110

<210> 75

<211> 33

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 75

ccaaaggctcg tacacagtga tggaaacacc tac

33

<210> 76

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 76

Pro Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr  
1 5 10

<210> 77

<211> 9

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 77

aagatttct

9

<210> 78

<211> 3

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 78

Lys Ile Ser

1

<210> 79

<211> 27

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 79

atgcaagcta cacatttcc gatcacc

27

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 80

Met Gln Ala Thr His Phe Pro Ile Thr

1 5

<210> 81

<211> 360

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 81

gaggtgcagc tggtggaatc tgggggaggt gtggtgccgc ctggggggtc cctgagactc

60

tcctgtcag cctctggatt cactttgat gattatggca tgacctgggt ccgccaagct

120

ccagggaggg gcctggaatg ggtctctgg attcatggc atggtaaacg cacaggttat

180

gcagactctg tgaagggccg attcaccata tccagagaca acgccaagaa atccctgtat

240

ctgcaaatga acagtctgaa aggcgaggac acggccttgt atcattgtgt gaggggggaa

300

atgagtacag gggactggtt cgaccctgg ggccaggaa ccctggcat cgtctcctca

360

<210> 82

<211> 120

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 82

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

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

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

Ser Gly Ile His Trp His Gly Lys Arg Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Gly Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys  
85 90 95

Val Arg Gly Gly Met Ser Thr Gly Asp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ser  
115 120

<210> 83

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 83

ggattcaatt ttgatgatta tggc

24

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 84

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly  
1 5

<210> 85

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223>	синтетическая	
<400>	85	
	attcattggc atggtaaacg caca	24
<210>	86	
<211>	8	
<212>	PRT	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	86	
Ile His Trp His Gly Lys Arg Thr		
1	5	
<210>	87	
<211>	39	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	87	
gtgaggggggg gaatgagtagc aggggactgg ttcgacccc		39
<210>	88	
<211>	13	
<212>	PRT	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	88	
Val Arg Gly Gly Met Ser Thr Gly Asp Trp Phe Asp Pro		
1	5	10
<210>	89	
<211>	324	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	89	
gacatccaga tgacctcagtc tccatcctcc ctgtctgcatt ctctaggaga cagagtacc		60
atcaacttgcc gggcaagtca gagcattaac agttatcaa attggtatca gcagaaaacca		120
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgtt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca		180
aggttcagtgc cagtggtatc tgggacagaa ttcaactctca ccatcagcaa tctgcaacct		240
gaagattttgc caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc		300

caaggacac gactggagat taaa

324

<210> 90  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 90

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

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

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

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

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

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

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

<210> 91  
<211> 18  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 91  
cagagcatta acagttat

18

<210> 92  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 92

Gln Ser Ile Asn Ser Tyr  
1 5

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 93  
gttgcatcc

9

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 94

Val Ala Ser  
1

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 95  
caacagagt acagtacccc tccgatcacc

30

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 96

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr  
1 5 10

<210> 97  
<211> 360  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 97  
gaggtgcagc tggtgaggc tgggggaggt gtggtaacggc cgggggggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt caccttgcat gattatggca tgacctgggt ccgccaagtt 120  
ccagggaaagg ggctggagtg ggtctctgg attcatggc gtggtagaaag cacaggttat 180  
gcagactctg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240  
ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccctgtt attactgtgc gaggggggg 300  
atgagtaacgg gggactggtt cgaccctgg ggccaggaa ccctggtcac cgtctccctca 360

<210> 98  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 98

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

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

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

Ser Gly Ile His Trp Ser Gly Arg Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Met Ser Thr Gly Asp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 99  
ggattcacct ttgatgatta tggc

24

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 100

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly  
1 5

<210> 101  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 101  
attcatttggaa gtggtagaaag caca

24

<210> 102  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 102

Ile His Trp Ser Gly Arg Ser Thr  
1 5

<210> 103  
<211> 39  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 103  
gcgaggggggg gaatgagtagac gggggactgg ttcgacccc

39

<210> 104  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 104

Ala Arg Gly Gly Met Ser Thr Gly Asp Trp Phe Asp Pro  
 1 5 10

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

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 105

gacatccaga	tgaccaggc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgttaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	ggccaagtca	gaggcattgc	agctattaa	attggtatca	gcagaaacca	120
gggaaaagccc	ctaagctcct	gatctatgtt	gcatccagtt	tgcaaagtgg	ggtccccatca	180
aggttcagtg	gcagtggatc	tgggacagat	ttcactctca	ccatcagcag	tctgcaacct	240
gaagagatttg	caacttacta	ctgtcaacag	agttacagta	cccctccgat	caccttcggc	300
caagggacac	gactggagat	taaa				324

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

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 106

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

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

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

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

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

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

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

<210> 107  
<211> 18  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 107  
cagagcatta gcagctat 18

<210> 108  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 108  
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
1 5

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 109  
gttgcatcc 9

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 110  
Val Ala Ser  
1

<210> 111  
<211> 30  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 111  
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc 30

<210> 112  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 112

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr  
1 5 10

<210> 113  
<211> 345  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 113

gaggtgcagt tggaggagtc tggaggaggc ttgggtccagc ctggggggtc cctaagactc 60  
tcctgtgcag cctctgggtt caccgtcggt agtaactaca tgaactgggt ccgtcaggct 120  
ccagggaaagg gactggagtg ggtctcagtt atttatagtg gtggtagtac atactacgca 180  
gattccgtga agggccgatt caccatctcc agactcactt ccaagaacac actgtatctt 240  
caaatgagca gcctgagacc tgaggacacg gccgtgtatt attgtgcgag agggattagg 300  
ggtctggacg tctggggcca agggaccacg gtcaccgtct cttca 345

<210> 114  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 114

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Gly Ser Asn  
20 25 30

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

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

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

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

Arg Gly Ile Arg Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 115  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 115  
gggttcaccg tcggtagtaa ctac

24

<210> 116  
<211> 8  
<212> РРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 116

Gly Phe Thr Val Gly Ser Asn Tyr  
1 5

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 117  
atttatagtg gtggtagtac a

21

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 118

Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr  
1 5

<210> 119  
<211> 27  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 119  
gcgagagggta ttaggggtct ggacgtc

27

<210> 120  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 120

Ala Arg Gly Ile Arg Gly Leu Asp Val  
1 5

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 121  
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gaccattaac atctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
gggagagccc ctaggctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tggacagat ttcaactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaccag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300  
caagggacac gactggagat taaa 324

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 122

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro  
85 90 95

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

<210> 123

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 123

cagaccattat acatctat

18

<210> 124

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 124

Gln Thr Ile Asn Ile Tyr

1 5

<210> 125

<211> 9

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 125

gctgcattcc

9

<210>	126	
<211>	3	
<212>	PRT	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	126	
Ala Ala Ser		
1		
<210>	127	
<211>	30	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	127	
caccagagtt acagtacccc tccgatcacc		30
<210>	128	
<211>	10	
<212>	PRT	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	128	
His Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr		
1	5	10
<210>	129	
<211>	345	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	129	
gaggaacggt tggggaggc tggaggagac ttgggtccagc ctggggggtc cctgagactc		60
tcctgtgcag cctctggcat caccgtcggt actaattata tgaactgggt ccgccaggct		120
ccagggaaagg gactggagtg ggtctcagtt atttctagcg gtggtaatac acactacgca		180
gactccgtga agggccgatt cattatgtcc agacaaactt ccaaaaacac gctgtatctt		240
cagatgaata gcctggaaac tgaggacacg gccgtatatt attgtgcgag ggggatcaga		300
ggtttggacg tctggggcca agggaccatg gtcaccgtct cctca		345
<210>	130	
<211>	115	

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 130

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Val Gly Thr Asn  
20 25 30

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

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

Gly Arg Phe Ile Met Ser Arg Gln Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

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

Arg Gly Ile Arg Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 131

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 131

ggcatcaccg tcggtactaa ttat

24

<210> 132

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 132

Gly Ile Thr Val Gly Thr Asn Tyr  
1 5

<210> 133  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 133  
atttctagcg gtggtaatac a 21

<210> 134  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 134

Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr  
1 5

<210> 135  
<211> 27  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 135  
gcgaggggga tcagaggttt ggacgtc 27

<210> 136  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 136

Ala Arg Gly Ile Arg Gly Leu Asp Val  
1 5

<210> 137  
<211> 324  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 137  
gacatccaga tgaccaggc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtacc 60

atcacttgcc	gggcaagtca	gagcatgagc	agctatttaa	attggtatca	gcagaaacca	120
gggagagccc	ctaagctcct	gatcttgct	gcatccagtt	tgcaaagtgg	ggtcccatca	180
aggtcagtg	gcagtggatc	tggacagat	ttcactctca	ccatcagcag	tctgcaacct	240
gaagatttg	caacttacta	ctgtcaacag	agttacagta	cccctccgat	caccttcggc	300
caagggacac	gactggagat	taaa				324

<210> 138

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 138

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

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

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

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

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

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

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

<210> 139

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 139

cagagcatga

18

<210> 140

<211> 6

<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 140

Gln Ser Met Ser Ser Tyr  
1 5

<210> 141  
<211> 9  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 141  
gctgcattcc

9

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 142

Ala Ala Ser  
1

<210> 143  
<211> 30  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 143  
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc

30

<210> 144  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 144

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr  
1 5 10

<210> 145  
<211> 354  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 145  
caggtccagc tggcagtc tggggctgag gtgaagatgc ctgggtcctc ggtgagggtc 60  
tcctgcaagg cttctggagg catcttcagc agttctacta tcagttgggt gcgacaggcc 120  
cctggacaag ggcttgaatg gatgggagag atcatccctg tctttggta agtaaactac 180  
gcacagaagt tccaggacag agtcatattt accgcggacg aatctacgac tacagcctac 240  
atggagctga gcagcctgaa atctggggac acggccgtat atttctgtgc gcgaaattgg 300  
ggattaggct cttttatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ttca 354

<210> 146  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 146

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

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ile Phe Ser Ser Ser  
20 25 30

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

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

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

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser  
115

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 147  
ggaggcatct tcagcagttc tact 24

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 148

Gly Gly Ile Phe Ser Ser Ser Thr  
1 5

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 149  
atcatccctg tctttggtagt agta 24

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 150

Ile Ile Pro Val Phe Gly Thr Val  
1 5

<210> 151  
<211> 33  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 151  
gcgcgaaatt ggggattagg ctcttttat atc 33

<210> 152  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 152

Ala Arg Asn Trp Gly Leu Gly Ser Phe Tyr Ile  
1 5 10

<210> 153  
<211> 324  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 153  
gaaatttgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtcttgc ctccagggga aagagccacc 60  
ctctcctgca gggccagtca gagtttaac ttcaactact tagcctggta ccagcagaaaa 120  
cctggccagg ctcccagact cctcatctat ggtgcattcca gcagggccac tggcatccca 180  
gacaggttca gtggcagtgg gtctggaca gacttcactc tcaccatcaa caggctggag 240  
cctgaagatt ttggagtggtt ttattgtcag cagtatgaaa ggcgcaccttg gacgttcggc 300  
caagggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 154  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 154

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Phe Asn Phe Asn  
20 25 30

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

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

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

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 155  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 155  
cagagtta acttcaacta c 21

<210> 156  
<211> 7  
<212> РРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 156

Gln Ser Phe Asn Phe Asn Tyr  
1 5

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 157  
ggtgcatcc 9

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 158

Gly Ala Ser  
1

<210> 159  
<211> 27

<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 159  
cagcagtatg aaagcgcacc ttggacg 27

<210> 160  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 160

Gln Gln Tyr Glu Ser Ala Pro Trp Thr  
1 5

<210> 161  
<211> 345  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 161  
gaggtgcagc ttgttagagtc tgggggagac ttggcacatc ctggcaggtc cctgagactc 60  
tccttgtcag cctctggttt cccctttgat gagtatgcc a tgcaactgggt ccggcaagtt 120  
ccagggaaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga gtaataataa cataggctat 180  
gcggactctg tgaaggcccg attcaccatc tccagagaca acgccaaaaa ctccctgtat 240  
ctacaaatga acagtctgag acctgaggac acggccctttt attactgtgc aaaatctgga 300  
atctttgact cctggggcca gggAACCGTCT cctca 345

<210> 162  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 162

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Asp Glu Tyr  
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Trp Ser Asn Asn Asn Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Lys Ser Gly Ile Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 163

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 163

ggttccct ttgatgagta tgcc

24

<210> 164

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 164

Gly Phe Pro Phe Asp Glu Tyr Ala  
1 5

<210> 165

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 165

attagttgga gtaataataa cata

24

<210> 166

<211> 8

<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 166

Ile Ser Trp Ser Asn Asn Asn Ile  
1 5

<210> 167  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 167  
gcaaaatctg gaatcttga ctcc 24

<210> 168  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 168

Ala Lys Ser Gly Ile Phe Asp Ser  
1 5

<210> 169  
<211> 315  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 169  
gacatccaga tgaccaggc tccatccccc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtccacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctattaa attggtatca gcagaaaacca 120  
gggaagctcc tgatctatgc tgcatccagt ttgcaaagtg gggtccccatc acggttcagt 180  
ggcggtggat ctgggacaga tttcaacttc accatcagca gtctgcgacc tgaagatttt 240  
gcaacttact actgtcaaca gagttactgt accccctccga tcacccctcg 300  
cgactggaga ttaaa 315

<210> 170  
<211> 105  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 170

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

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

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

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

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

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Cys Thr Pro Pro Ile Thr Phe  
85 90 95

Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 171

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 171

cagagcatta gcagctat

18

<210> 172

<211> 6

<212> РРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 172

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
1 5

<210> 173

<211> 9

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	173	
	gctgcattc	9
<210>	174	
<211>	3	
<212>	PRT	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	174	
	Ala Ala Ser	
	1	
<210>	175	
<211>	30	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	175	
	caaacagagtt actgtacccc tccgatcacc	30
<210>	176	
<211>	10	
<212>	PRT	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	176	
	Gln Gln Ser Tyr Cys Thr Pro Pro Ile Thr	
	1 5 10	
<210>	177	
<211>	354	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	177	
	gaggtgcagc tggtggagtc cgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt ccgccaggct	120
	ccaggcaagg gactggagtg ggtgacactt atatcatatg aggaaaggaa taaatactat	180
	gcagactccg tgaaggcccg attcaccatt tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtat attactgtgc gaaagatagg 300  
acccttacg gtatggacgt ctggggccaa ggaaccacgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 178  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 178

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 179  
ggattcacct tcagtagtta tggc

24

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 180

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly  
1 5

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 181  
atatcatatg aggaaaggaa taaa

24

<210> 182  
<211> 8  
<212> РРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 182

Ile Ser Tyr Glu Gly Arg Asn Lys  
1 5

<210> 183  
<211> 33  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 183  
gcgaaaagata ggacccttta cggatggac gtc

33

<210> 184  
<211> 11  
<212> РРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 184

Ala Lys Asp Arg Thr Leu Tyr Gly Met Asp Val  
1 5 10

<210> 185  
<211> 363

<212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> синтетическая  
  
 <400> 185  
 caggtcacct tgagggagtc tggcctgcg ctggtgaaaa ccacacagac cttcacactg 60  
 acctgcacct tctctgggtt ctcactcagc actaatagaa tgtgtgtgac ctggatccgt 120  
 cagccccca ggaaggccct ggagtggctt gcgcgcattt attggatgg tgttaatac 180  
 tacaacacat ctctgaagac caggctcacc atctccaagg acacctccaa aaaccaggta 240  
 gtccttacaa tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca cttttactg tgcacggtcg 300  
 acttcgttga cttttacta cttgactac tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc 360  
 tca 363

<210> 186  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> синтетическая  
  
 <400> 186

Gln	Val	Thr	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	Thr	Thr	Gln
1															15

Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Asn
					20			25							30

Arg	Met	Cys	Val	Thr	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu
								35				45			

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

Leu	Lys	Thr	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
								65			75				80

Val	Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Phe	Tyr
									85					95	

Cys	Ala	Arg	Ser	Thr	Ser	Leu	Thr	Phe	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
									100					110	

Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
								115							120

<210> 187		
<211> 30		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> синтетическая		
<400> 187		
gggttctcac tcagcactaa tagaatgtgt		30
<210> 188		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> синтетическая		
<400> 188		
Gly Phe Ser Leu Ser Thr Asn Arg Met Cys		
1	5	10
<210> 189		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> синтетическая		
<400> 189		
attgattggg atgggttaa a		21
<210> 190		
<211> 7		
<212> PRT		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> синтетическая		
<400> 190		
Ile Asp Trp Asp Gly Val Lys		
1	5	
<210> 191		
<211> 39		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> синтетическая		
<400> 191		
gcacgggtcga cttcgttgac tttttactac tttgactac		39

<210> 192  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 192

Ala Arg Ser Thr Ser Leu Thr Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr		
1	5	10

<210> 193  
 <211> 324  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 193

gacatccaga tgaccaggc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctattaa attggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagagtttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc	300
caagggacac gactggagat taaa	324

<210> 194  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 194

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20	25	30
----	----	----

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35	40	45
----	----	----

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50	55	60
----	----	----

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65	70	75	80
----	----	----	----

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

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

<210> 195  
<211> 18  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 195  
cagagcatta gcagctat 18

<210> 196  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 196

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
1 5

<210> 197  
<211> 9  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 197  
gctgcattcc 9

<210> 198  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 198

Ala Ala Ser  
1

<210> 199  
<211> 30

<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 199  
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc 30

<210> 200  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 200

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr  
1 5 10

<210> 201  
<211> 345  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 201  
gaggtgcagc tggtggagtc tggaggaggc ttgggtccagc cgggggggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctgagtt caccgtcggt accaaccaca tgaactgggt ccgccaggct 120  
ccagggaaagg gactggagtg ggtctcagtt atttatacg 180  
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agacacactt ccaagaacac gctgtatctt 240  
caaatgaaca gcctgacagc agaggacacg gccgtatatt actgtgcgcg aggattgggg 300  
ggtatggacg tctggggcca agggaccacg gtcaccgtct cctca 345

<210> 202  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 202

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Val Gly Thr Asn  
20 25 30

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

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

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

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

Arg Gly Leu Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 203

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 203

gagttcaccg tcggtagccaa ccac

24

<210> 204

<211> 8

<212> РРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 204

Glu Phe Thr Val Gly Thr Asn His  
1 5

<210> 205

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 205

atttatagcg gtggtaaacac a

21

<210> 206

<211> 7

<212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 206

Ile Tyr Ser Gly Gly Asn Thr  
 1 5

<210> 207  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 207  
 gcgcgaggat tggggggat ggacgtc 27

<210> 208  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 208

Ala Arg Gly Leu Gly Gly Met Asp Val  
 1 5

<210> 209  
 <211> 321  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 209  
 gacatccaga tgacctcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtacc 60  
 atcacttgcc gggcgagtca ggtcatttgc aattatttgc cctggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagttc cttaggctcct gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180  
 cgtttcagtg gcagtggatc tggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagatgttgc caacttatta ctgtcaaaag tataacagtgc cccctcggac gttcggccaa 300  
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

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

<220>

<223> синтетическая

<400> 210

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Arg  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 211

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 211

caggtcatta gcaattat

18

<210> 212

<211> 6

<212> РРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 212

Gln Val Ile Ser Asn Tyr  
1 5

<210> 213

<211> 9

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	213	
	gctgcacatcc	9
<210>	214	
<211>	3	
<212>	PRT	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	214	
	Ala Ala Ser	
1		
<210>	215	
<211>	27	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	215	
	caaaaagtata acagtgcccc tcggacg	27
<210>	216	
<211>	9	
<212>	PRT	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	216	
	Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Arg Thr	
1	5	
<210>	217	
<211>	360	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетическая	
<400>	217	
	gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttgggtccagc ggggggagtc cctgagactt	60
	tactgtgcag cctctggatt caccttttagt aaatatggta tgaactgggt ccgccaggct	120
	ccagggaaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaaggag atggaagtga gaaatactat	180
	gtggactctg tgaaggcccgt gttcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactat	240

ctacaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagattat 300  
tggggatcg gctactactt tgacttctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 218  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 218

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gly Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Tyr Trp Gly Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 219  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 219

ggattcacct ttagtaata ttgg 24

<210> 220  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 220

Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr Trp  
1 5

<210> 221  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 221  
ataaagggag atggaagtga gaaa

24

<210> 222  
<211> 8  
<212> РРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 222

Ile Lys Gly Asp Gly Ser Glu Lys  
1 5

<210> 223  
<211> 39  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 223  
gcgagagatt attggggatc aggctactac tttgacttc

39

<210> 224  
<211> 13  
<212> РРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 224

Ala Arg Asp Tyr Trp Gly Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe  
1 5 10

<210> 225  
<211> 321

<212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> синтетическая  
  
 <400> 225  
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtcacc 60  
 atcaacttgcc gggcaagtca gaacattaac aactatcaa attggtatca gcagaaaacca 120  
 gggaaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tccaaaatgc ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tggacagat ttcaactcta ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacaata ccccgctcac tttcggcggg 300  
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 226  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> синтетическая  
  
 <400> 226

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asn Thr Pro Leu  
 85 90 95

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

<210> 227  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>

<223> синтетическая

<400> 227  
cagaacatta acaactat 18

<210> 228  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 228

Gln Asn Ile Asn Asn Tyr  
1 5

<210> 229  
<211> 9  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 229  
gctgcattcc 9

<210> 230  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 230

Ala Ala Ser  
1

<210> 231  
<211> 27  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 231  
caacagagtt acaatacccc gtcact 27

<210> 232  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 232

Gln Gln Ser Tyr Asn Thr Pro Leu Thr  
1 5

<210> 233

<211> 390

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 233

gaggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttggtcagt	ctggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	caccttagt	agctattgga	tgagctgggt	ccgccaggct	120
ccagggaaagg	ggctggagtg	ggtggccaac	ataaagcaag	atggaagtga	gaaatactat	180
gtggactctg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	acgccaagaa	ctcactgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agccgatgac	acggctgtgt	attactgtgc	gagagatgat	300
attgttagtag	taccagctcc	tatggatat	tactactact	acttcggtat	ggacgtctgg	360
ggccaaggga	ccacggtcac	cgtctcctca				390

<210> 234

<211> 130

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 234

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Asp Ile Val Val Pro Ala Pro Met Gly Tyr Tyr Tyr  
100 105 110

Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
115 120 125

Ser Ser  
130

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 235  
ggattcacct ttagtagcta ttgg 24

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 236

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp  
1 5

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 237  
ataaaagcaag atggaagtga gaaa 24

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

<220>  
<223> синтетическая

<400> 238

Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys  
1 5

<210> 239  
 <211> 69  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 239  
 gcgagagatg atattgtagt agtaccagct cctatggat attactacta ctacttcggt 60  
 atggacgtc 69

<210> 240  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 240  
 Ala Arg Asp Asp Ile Val Val Val Pro Ala Pro Met Gly Tyr Tyr Tyr  
 1 5 10 15

Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val  
 20

<210> 241  
 <211> 321  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 241  
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagcgccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagcg gcagtggatc tggacagaaa ttcaactctca caatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagattttgc caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccgtacac ttttggccag 300  
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 242  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 242

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Tyr  
85 90 95

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

<210> 243

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 243

caggcattaa gaaatgat

18

<210> 244

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 244

Gln Gly Ile Arg Asn Asp

1 5

<210> 245

<211> 9

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 245  
gctgcattcc 9

<210> 246  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 246

Ala Ala Ser  
1

<210> 247  
<211> 27  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 247  
ctacagcata atagttaccc gtacact 27

<210> 248  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 248

Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 249  
<211> 369  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 249

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtcagc ctggcaggc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttgat gatttgccca tgcactgggt ccgacaagct 120

ccagggaaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga ctggtggtaa catggactat 180

gcgaactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagagg acgccaagaa ttccctgtat 240

ctgcaaatga acagtctgag agctgcggac acggcccttgtt attactgtgt aaaagatata 300

agggggatag tggctacggg gggggctttt gatatctggg gccgagggac aatggtcacc 360

<210> 250  
<211> 123  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 250

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

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Phe
															30
								25							

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

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

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

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys
															95
									85		90				80

Val	Lys	Asp	Ile	Arg	Gly	Ile	Val	Ala	Thr	Gly	Gly	Ala	Phe	Asp	Ile
															110
									100		105				95

Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser
									115	120

<210> 251  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 251  
ggattcacct ttgatgattt tgcc

24

<210> 252  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая  
<400> 252

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Phe Ala  
1 5

<210> 253  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 253  
attagttgga ctgggtggtaa catg 24

<210> 254  
<211> 8  
<212> РРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 254

Ile Ser Trp Thr Gly Gly Asn Met  
1 5

<210> 255  
<211> 48  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 255  
gtaaaaagata taagggggat agtggctacg gggggggc ttgatatc 48

<210> 256  
<211> 16  
<212> РРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 256

Val Lys Asp Ile Arg Gly Ile Val Ala Thr Gly Gly Ala Phe Asp Ile  
1 5 10 15

<210> 257  
<211> 321  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 257  
gacatccaga tgaccaggc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtcacc 60  
atctttgcc gggcaagtca gaccattagc acttatttaa attggttca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgtt gtgtccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtgc cagtggtatc tggacagat ttcaactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttatta ctgtcaacag agttacagta ccccattcac tttcgccct 300  
gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 258

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 258

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
100 105

<210> 259

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 259  
cagaccattt gcacttat 18

<210> 260  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 260

Gln Thr Ile Ser Thr Tyr  
1 5

<210> 261  
<211> 9  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 261  
gttgtgtcc 9

<210> 262  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 262

Val Val Ser  
1

<210> 263  
<211> 27  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 263  
caacagagtt acagtacccc attcact 27

<210> 264  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 264

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe Thr  
1 5

<210> 265

<211> 345

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 265

gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttgggtccagc cggggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccgtcggt accaactaca tgaactgggt ccgccaggct 120

ccagggaaagg gactggagtg gatctcagtt atttatacgat gtggtagcac attctacgca 180

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agacagactt cccagaacac gctgttatctt 240

caaataaca gcctgagacc tgaggacacg gccgtatatt actgtgcgag aggtatacgt 300

ggttttgata tctggggcca aggacaatg gtcaccgtct ctta 345

<210> 266

<211> 115

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 266

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Gly Thr Asn  
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Gln Thr Ser Gln Asn Thr Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

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

Arg Gly Ile Arg Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 267  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 267  
ggattcaccg tcggtagccaa ctac

24

<210> 268  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 268

Gly Phe Thr Val Gly Thr Asn Tyr  
1 5

<210> 269  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 269  
atttatagcg gtggtagcac a

21

<210> 270  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 270

Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr  
1 5

<210> 271  
<211> 27  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая  
 <400> 271  
 gcgagaggta tacgtggttt tgatatc 27

<210> 272  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 272  
 Ala Arg Gly Ile Arg Gly Phe Asp Ile  
 1 5

<210> 273  
 <211> 324  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 273  
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctattaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgta 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tggcacagat ttcaactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagatttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat cacttcggc 300  
 caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 274  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 274  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 275

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 275

cagagcatta gcagctat

18

<210> 276

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 276

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

1 5

<210> 277

<211> 9

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 277

gctgcattcc

9

<210> 278

<211> 3

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 278

Ala Ala Ser  
1

<210> 279  
<211> 30  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 279  
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc

30

<210> 280  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 280

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr  
1 5 10

<210> 281  
<211> 345  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 281  
gaggtgcagc tggggaggc tggaggaggc ttgggtccagc cgggggggtc cctgagactc  
tcctgtgcag cctctgggtt taccatcagt accaactaca tgaactgggt ccgccaggct  
ccagggaaagg ggctggagtg ggtcgcagtt atttatagca gtggttccac atactatatc  
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agactcactt ccaagaacac ggtgtatctt  
caaatgagca gcctgaattc tgaagacacg gccgtgtatt actgtgcgag ggggatcagg  
ggttttgata tttggggcca agggacaatg gtcaccgtct ctta

60

120

180

240

300

345

<210> 282  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 282

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Thr Asn  
20 25 30

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

Ala Val Ile Tyr Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ile Asp Ser Val Lys  
50 55 60

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

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

Arg Gly Ile Arg Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 283

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 283

gggtttacca tcagtagccaa ctac

24

<210> 284

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 284

Gly Phe Thr Ile Ser Thr Asn Tyr

1 5

<210> 285

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 285		
atttatacgca gtgggtccac a		21
<210> 286		
<211> 7		
<212> PRT		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> синтетическая		
<400> 286		
Ile Tyr Ser Ser Gly Ser Thr		
1	5	
<210> 287		
<211> 27		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> синтетическая		
<400> 287		
gcgagggggga tcaggggttt tgatatt		27
<210> 288		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> синтетическая		
<400> 288		
Ala Arg Gly Ile Arg Gly Phe Asp Ile		
1	5	
<210> 289		
<211> 372		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> синтетическая		
<400> 289		
gaagtgcagc tgggtggagtc gggggggaggc ttgggtacagc ctggcaggc cctgagactc		60
tccttgtcag cctctggatt caccattgtat gatagtgcac tgcaactgggt ccggcaaact		120
ccagggaaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga aaagtggtag catagttat		180
gcggactctg tgaggggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ttccctctat		240
ctgcaaatacg acaatctgag agttgaggac acggccctgt attactgtgt aaaagatata		300
aggggcaact ggaactacgg gggaaactgg ttgcaccctt gggccaggc aaccctggc		360

actgtctcct ca

372

<210> 290  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 290

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asp Asp Ser  
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Trp Lys Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Val Lys Asp Ile Arg Gly Asn Trp Asn Tyr Gly Gly Asn Trp Phe Asp  
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 291  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 291  
ggattcacca ttgatgatag tgcc

24

<210> 292  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 292

Gly Phe Thr Ile Asp Asp Ser Ala  
1 5

<210> 293  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 293  
attatgttga aaagtggtag cata 24

<210> 294  
<211> 8  
<212> РРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 294

Ile Ser Trp Lys Ser Gly Ser Ile  
1 5

<210> 295  
<211> 51  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 295  
gtaaaaagata taaggggcaa ctggaactac gggggaaact ggttcgacc c 51

<210> 296  
<211> 17  
<212> РРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 296

Val Lys Asp Ile Arg Gly Asn Trp Asn Tyr Gly Gly Asn Trp Phe Asp  
1 5 10 15

Pro

<210> 297  
 <211> 345  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 297  
 gaggtgcagc tggggaggc tggaggaggc ttgggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcatgtgaag cctctgggtt caccgtcggt gtcaaccaca tgaactgggt ccgccaggct 120  
 ccagggaaagg gtctggagtg ggtctcagtt atttcagta gtggtaggac attctacgga 180  
 gactacgtga aggggacgatt aaccatctc agacaaacct cccagaacac ggtgtatctt 240  
 caaatgaata gcctgagaag tgaggacacg gccatatatt actgtgcgag agggattggc 300  
 ggtttggaca tctggggccg agggacaatg gtcaccgtct cttca 345

<210> 298  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 298  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Val Gly Val Asn  
 20 25 30

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

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

Gly Arg Leu Thr Ile Phe Arg Gln Thr Ser Gln Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80

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

Arg Gly Ile Gly Gly Leu Asp Ile Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

<210> 299  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 299  
gggttcaccg tcgggtgtcaa ccac 24

<210> 300  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 300

Gly Phe Thr Val Gly Val Asn His  
1 5

<210> 301  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 301  
attttcagta gtggtaggac a 21

<210> 302  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 302

Ile Phe Ser Ser Gly Arg Thr  
1 5

<210> 303  
<211> 27  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 303  
gcgagaggga ttggcggtt ggacatc 27

<210> 304  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 304

Ala Arg Gly Ile Gly Gly Leu Asp Ile  
1 5

<210> 305  
<211> 369  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 305  
gaagtgcagc tgggggaggc ttgggttcagc ctggcaggc cctaagactc 60  
tccttgtcag cctctggatt caccttgat gattatgcct tgcaactgggt ccggcaagct 120  
ccagggaaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga ctgggtgtac tatagactat 180  
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240  
ctgcaaatga gcagtctgag aactgaggac acggccatat attactgtac aagagatatc 300  
cgggggaact ggaagtacgg aggctggttc gacccttggg gccaggaaac cctggtcacc 360  
gtctccctca 369

<210> 306  
<211> 123  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 306

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Trp Thr Gly Gly Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Thr Arg Asp Ile Arg Gly Asn Trp Lys Tyr Gly Gly Trp Phe Asp Pro  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 307

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 307

ggattcacct ttgatgatta tgcc

24

<210> 308

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 308

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala

1 5

<210> 309

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 309

attagttgga ctgggtggac tata

24

<210> 310

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 310

Ile Ser Trp Thr Gly Gly Thr Ile  
1 5

<210> 311  
<211> 48  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 311  
acaagagata tccgggggaa ctggaagtac ggaggctggt tcgacc 48  
ccc

<210> 312  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 312

Thr Arg Asp Ile Arg Gly Asn Trp Lys Tyr Gly Gly Trp Phe Asp Pro  
1 5 10 15

<210> 313  
<211> 360  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 313  
caggtgcagc tggtgcaagtc tggactgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagg 60  
tcctgcaagg cttctggata cacccacc gcctactata tgcaactgggt gcgacaggcc  
cctggtaag gacttgactg gatggatgg atcagcccta acagtggttt cacaactat 120  
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcaa cacatttat  
atggagctga gtggactgag atctgacgac acggccgtat attactgtgc gcgagagggt  
tctactcacc acaattctt cgaccctgg ggccaggaa ccctggtcac cgtctcctca 180  
240  
300  
360

<210> 314  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 314

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asn Thr Phe Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Ser Thr His His Asn Ser Phe Asp Pro Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 315

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 315

ggatacacacct tcaccgccta ctat

24

<210> 316

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 316

Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr Tyr

1 5

<210> 317

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 317  
atcagcccta acagtggttt caca

24

<210> 318  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 318

Ile Ser Pro Asn Ser Gly Phe Thr  
1 5

<210> 319  
<211> 39  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 319  
gcgcgagagg gttctactca ccacaattct ttcgacccc

39

<210> 320  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 320

Ala Arg Glu Gly Ser Thr His His Asn Ser Phe Asp Pro  
1 5 10

<210> 321  
<211> 342  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 321

gaggtgcagc tggtggagtc tggaggaggc ttggccaac cgggggggtc cctgaggctc  
60  
tcctgtgcag cctctgggtt caccgtcggt actaacttca tgaattgggt ccgccaggct  
120  
ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcagcg atttatacg gttgtaccgc taactacgca  
180  
gactccgtga agggccgatt caccatttcc agagacactt ccaggaacac gctgtatctt  
240  
caaatgaaca gcctgagaac tgaggacacg gccgtttatt attgtgcgag aggggggggt  
300  
atggacgtct ggggccaagg gaccacggc accgtctcct ca  
342

<210> 322  
<211> 114  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 322

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Gly Thr Asn  
20 25 30

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

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

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

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

Arg Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
100 105 110

Ser Ser

<210> 323  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 323  
gggttcaccg tcggtaactaa cttc

24

<210> 324  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 324

Gly Phe Thr Val Gly Thr Asn Phe  
1 5

<210> 325  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 325  
atttatagcg gtggtagccgc t 21

<210> 326  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 326

Ile Tyr Ser Gly Gly Thr Ala  
1 5

<210> 327  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 327  
gctttttttt ggggtatggc cgtc 24

<210> 328  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 328

Ala Arg Gly Gly Gly Met Asp Val  
1 5

<210> 329  
<211> 354  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 329  
caggtccagc tggtgcaagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60  
tcctgcaagg cttctggagg caccttcaac acctatgttc tcagctgggt gcgcacaggcc 120  
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagag atcatcccta tcttaggtgc agcaaactac 180  
gcacagaact tccagggcag agtcactttt accacggacg aatccacgaa tacagcctac 240  
atggacactga gcagcctaag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcgg 300  
acctccgggg ggttcgaccc ctggggccag ggaaccctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 330  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 330

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

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

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

Gly	Glu	Ile	Ile	Pro	Ile	Leu	Gly	Ala	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Asn	Phe	
																50
																55
																60

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

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

Ala	Arg	Asp	Arg	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
																100
																105
																110

Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
																115

<210> 331  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 331  
ggaggcacct tcaacaccta tgtt 24

<210> 332  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 332

Gly Gly Thr Phe Asn Thr Tyr Val  
1 5

<210> 333  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 333  
atcatcccta tcttaggtgc agca 24

<210> 334  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 334

Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ala Ala  
1 5

<210> 335  
<211> 33  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 335  
gcgagagatc ggacctccgg ggggttcgac ccc 33

<210> 336  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 336

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

<210> 337

<211> 357

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 337

cagtttcagc tggcgcagtc tggagctgag gtggagaagc ctggggcctc agtgaaggc 60  
tcctgcaagg cttctggta catcttacc cactatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120  
cctggacaag gacttgagtg ggtggctgg atcagccctt acaatggta cacagactat 180  
gcacagaaac tccagggcag agtcacccctg accacagaca catccacgac cacagcctac 240  
atggagctga ggaacctgag atctgacgac acggccatgt attactgttc gagagggagg 300  
ggcccttact ggtcattcga tctctgggc cgtggcaccc tggtcaccgt ctccctca 357

<210> 338

<211> 119

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 338

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Leu  
50 55 60

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

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

Ser Arg Gly Arg Gly Pro Tyr Trp Ser Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 339  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 339  
ggttacatct ttacccacta tggt 24

<210> 340  
<211> 8  
<212> РРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 340

Gly Tyr Ile Phe Thr His Tyr Gly  
1 5

<210> 341  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 341  
atcagccctt acaatggta caca 24

<210> 342  
<211> 8  
<212> РРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 342

Ile Ser Pro Tyr Asn Gly Tyr Thr  
1 5

<210> 343  
<211> 36  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 343

tcgagaggga ggggccccta ctggtccttc gatctc

36

<210> 344

<211> 12

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 344

Ser Arg Gly Arg Gly Pro Tyr Trp Ser Phe Asp Leu  
1                   5                   10

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Меченный радиоактивной меткой конъюгат антитела, включающий антитело или его антигенсвязывающие фрагмент, которые связывают мономерный человеческий лиганд 1 программируемой смерти клетки (PD-L1), хелатирующий фрагмент и позитронный излучатель.

2. Конъюгат по п. 1, при этом указанный конъюгат включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают PD-L1, при этом указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно связаны с одним или несколькими фрагментами формулы (A)

-L-M<sub>Z</sub>

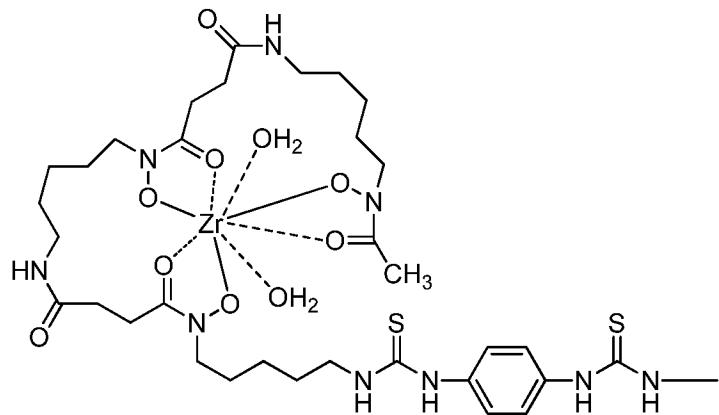
(A),

в которой L представляет собой хелатирующий фрагмент; M представляет собой позитронный излучатель; и z независимо в каждом случае равняется 0 или 1; и при этом по меньшей мере один из z равняется 1.

3. Конъюгат по пп. 1 или 2, при этом хелатирующий фрагмент включает в себя дезферриоксамин.

4. Конъюгат по любому из пп. 1-3, в котором позитронный излучатель представляет собой <sup>89</sup>Zr.

5. Конъюгат по любому из пп. 2-4, в котором -L-M представляет собой



6. Соединение по любому из пп. 1-5, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно связаны с одним, двумя или тремя фрагментами формулы (A).

7. Коньюгат по любому из пп. 1-6, в котором антитело обладает одним или несколькими свойствами, выбранными из группы, состоящей из:

- (а) связывания мономерного PD-L1 с равновесной константой диссоциации связывания ( $K_D$ ) менее чем приблизительно 310 пМ, как измерено в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C;
- (б) связывания мономерного PD-L1 человека с  $K_D$  менее чем приблизительно 180 пМ в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C;
- (с) связывания димерного PD-L1 человека с  $K_D$  менее чем приблизительно 15 пМ, как измерено в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C; и
- (д) связывания димерного PD-L1 человека с  $K_D$  менее чем приблизительно 8 пМ в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.

8. Коньюгат по любому из пп. 1-7, в котором антитело содержит три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), при этом HCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 34, 50, 82, 98, 146, 162, 178, 186, 234, 250, 266, 290, 306, 314 и 330; и три определяющих комплементарность области легкой цепи (LCDR) в вариабельной области легкой цепи (LCVR), при этом LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 42, 58, 90, 106, 154, 170, 194, 242, 258 и 274.

9. Коньюгат по любому из пп. 1-8, в котором антитело содержит три CDR в HCVR согласно SEQ ID NO: 82 и три CDR в LCVR согласно SEQ ID NO: 90.

10. Способ визуализации ткани, которая экспрессирует PD-L1, предусматривающий введение меченного радиоактивной меткой коньюгата антитела по любому из пп. 1-9 в ткань и визуализацию экспрессии PD-L1 с помощью визуализации позитронной эмиссионной томографией (ПЭТ).

11. Способ лечения опухоли, предусматривающий:

- (а) отбор субъекта с солидной опухолью;

(b) определение того, что солидная опухоль является PD-L1-позитивной; и  
(c) введение одной или нескольких доз ингибитора сигнальной оси PD-1/PD-L1 субъекту, нуждающемуся в этом.

12. Способ по п. 11, при котором стадия (b) предусматривает:

(i) введение меченного радиоактивной меткой коньюгата антитела по любому из пп. 1-9 субъекту, нуждающемуся в этом; и  
(ii) визуализацию локализации меченного радиоактивной меткой коньюгата антитела в опухоли с помощью визуализации позитронной эмиссионной томографией (ПЭТ), при этом наличие меченого радиоактивной меткой коньюгата антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является PD-L1-позитивной.

13. Способ по п. 12, при котором субъекту вводят 0,1-10 мг/кг меченого радиоактивной меткой коньюгата антитела.

14. Способ по пп. 12 или 13, при котором меченный радиоактивной меткой коньюгат антитела вводят субъекту подкожно или внутривенно.

15. Способ по любому из пп. 12-14, при котором PET визуализацию осуществляют через 2-7 дней после введения меченого радиоактивной меткой коньюгата антитела.

16. Способ по любому из пп. 12-15, при котором стадию (b) выполняют перед лечением субъекта ингибитором сигнальной оси PD-1/PD-L1.

17. Способ по любому из пп. 12-15, дополнительно предусматривающий:

(a) введение меченого радиоактивной меткой коньюгата антитела после лечения субъекта по меньшей мере с одной дозой ингибитора сигнальной оси PD-1/PD-L1; и  
(b) визуализацию локализации меченого радиоактивной меткой коньюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ визуализации, при этом снижение от исходного уровня на участке локализации меченого радиоактивной меткой коньюгата антитела в опухоли указывает на регрессию опухоли.

18. Способ по п. 17, при котором субъекту вводят меченный радиоактивной меткой коньюгат антитела через 1-20 недель после введения ингибитора сигнальной оси PD-1/PD-L1.

19. Способ по любому из пп. 11-18, при котором опухоль выбрана из группы, состоящей из рака крови, рака головного мозга, почечноклеточного рака, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака молочной железы, печеночноклеточной карциномы, рака кости, рака толстого кишечника, немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака толстой и прямой кишки, мезотелиомы, В-клеточной лимфомы и меланомы.

20. Способ по любому из пп. 11-19, при котором ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 представляет собой антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

21. Способ по п. 20, при котором антитело против PD-1 выбрано из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба и REGN2810.

22. Способ по любому из пп. 11-19, при котором ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 представляет собой антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

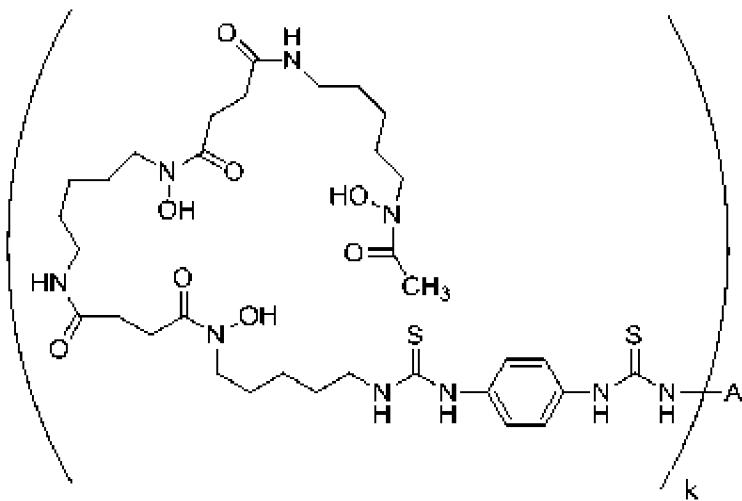
23. Способ по п. 22, при котором антитело против PD-L1 представляет собой атезолизумаб.

24. Способ по п. 22, при котором антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) согласно SEQ ID NO: 82 и три определяющих комплементарность области легкой цепи (LCDR) в вариабельной области легкой цепи (LCVR) согласно SEQ ID NO: 90.

25. Способ по п. 22, при котором антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три HCDR (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три LCDR (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), при этом HCDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 84; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 86; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 88; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 92; LCDR2 содержит аминокислотную

последовательность согласно SEQ ID NO: 94, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 96.

26. Соединение формулы (III):



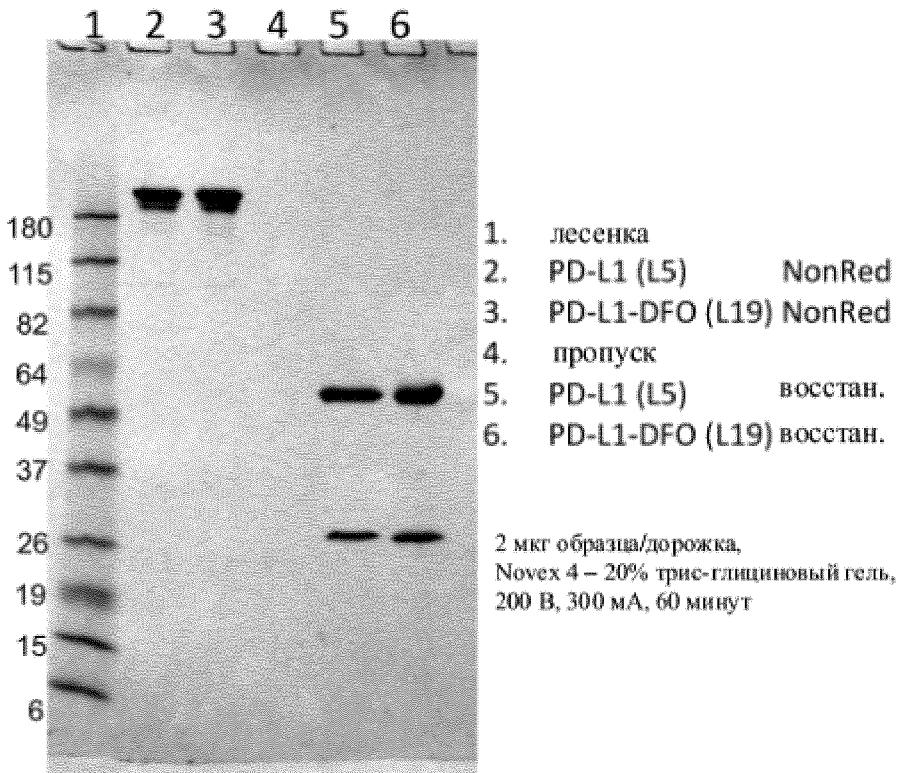
,  
при этом А представляет собой антитело или его антигенсвязывающие фрагмент, которые связывают PD-L1, и k равняется целому числу от 1 до 30.

**Фиг. 1**

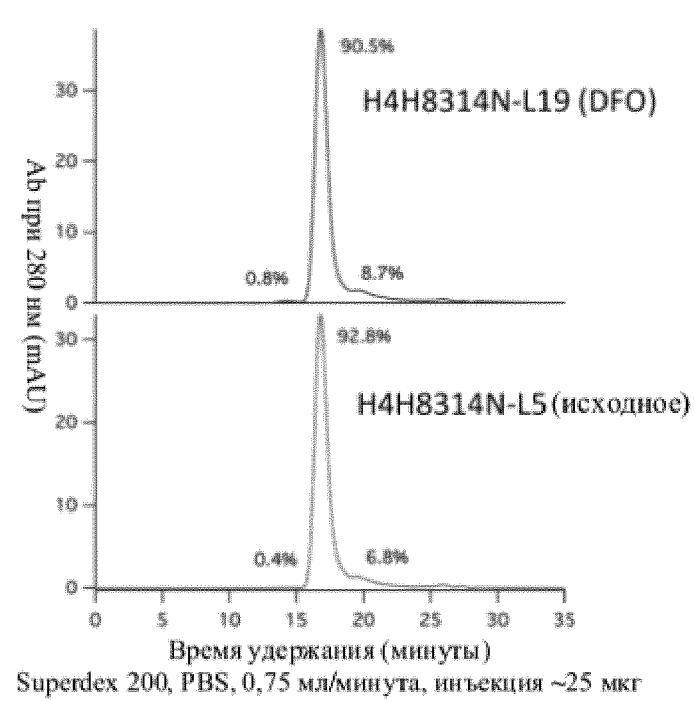
1/12

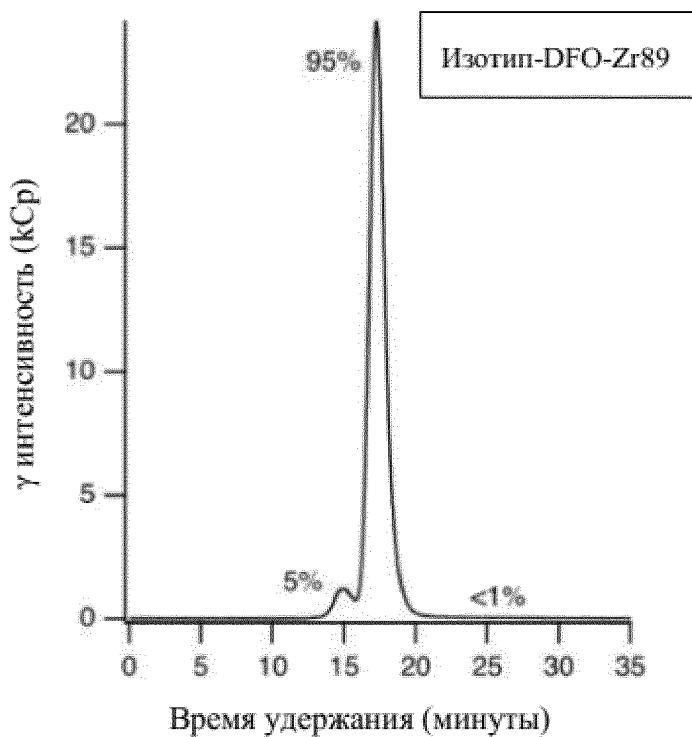
### Характеристика H4H8314N-DFO

SDS-PAGE: подобные профили подвижности исходного антитела против PD-L1 и конъюгата с DFO

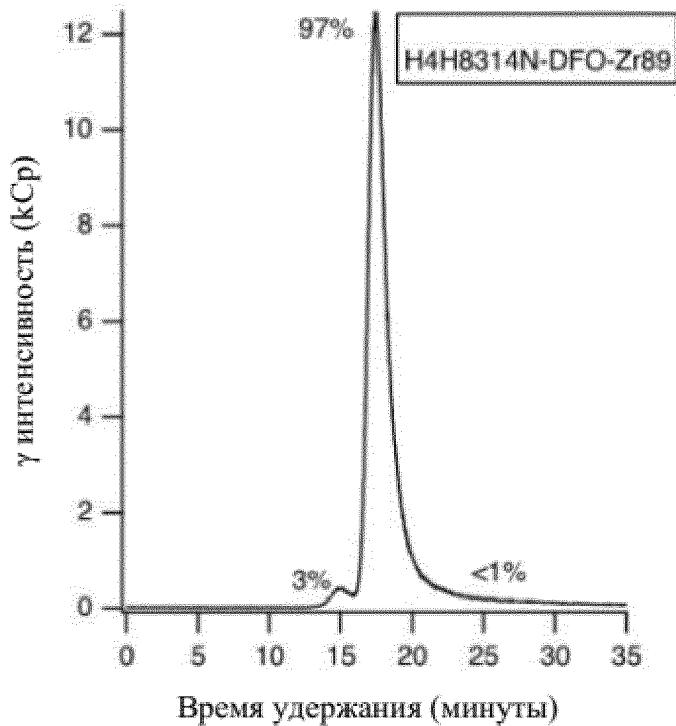


SEC: < 1% агрегата

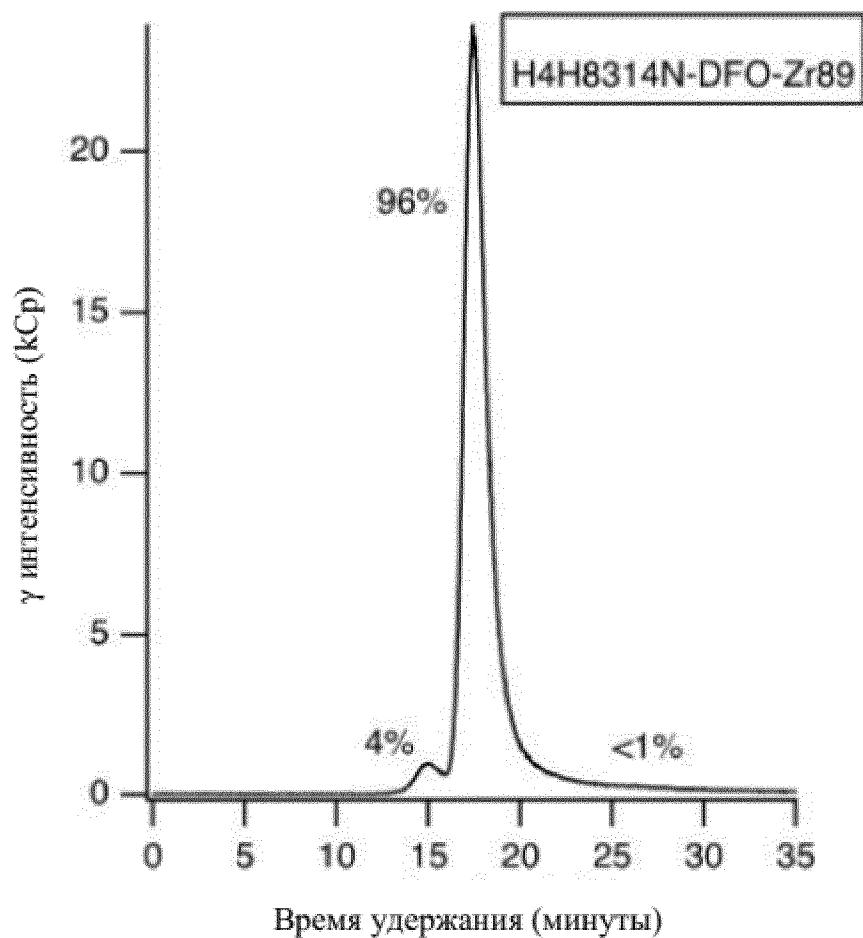




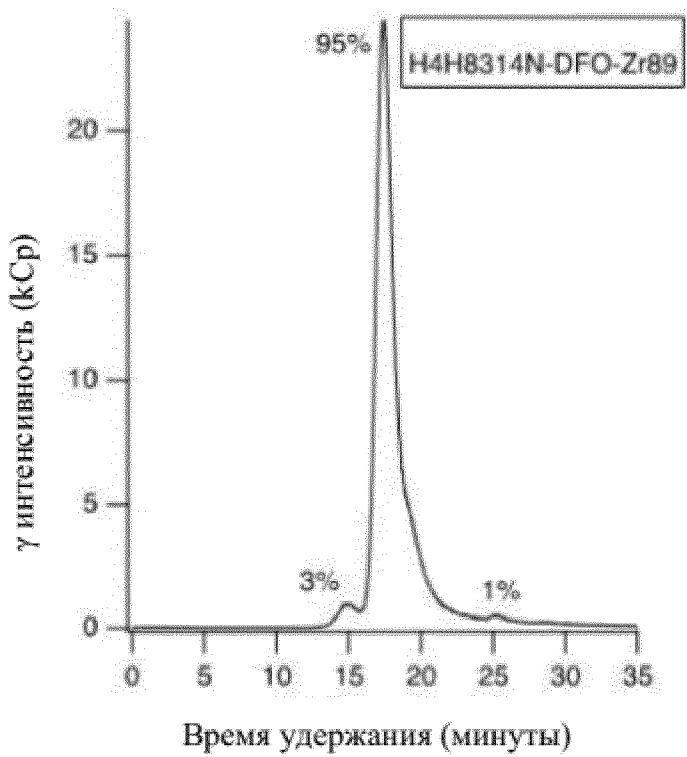
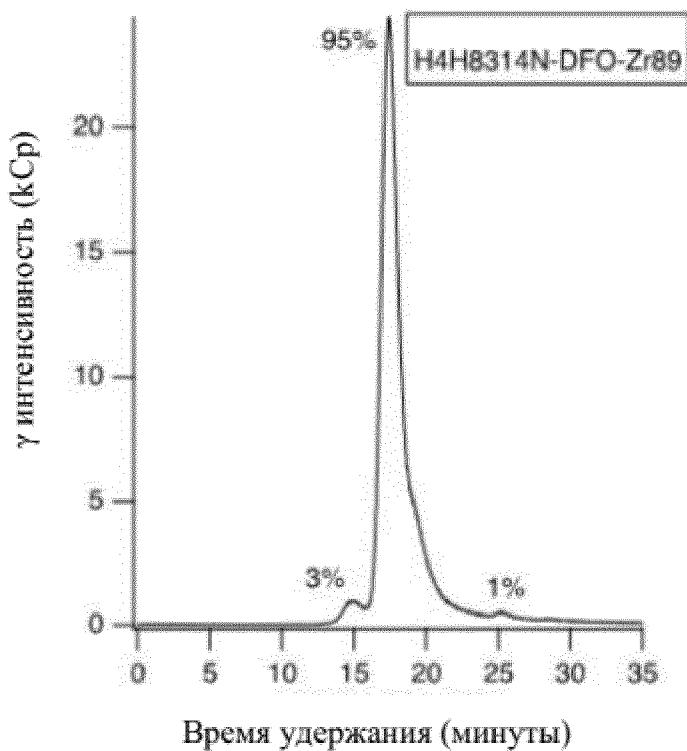
Фиг. 2А



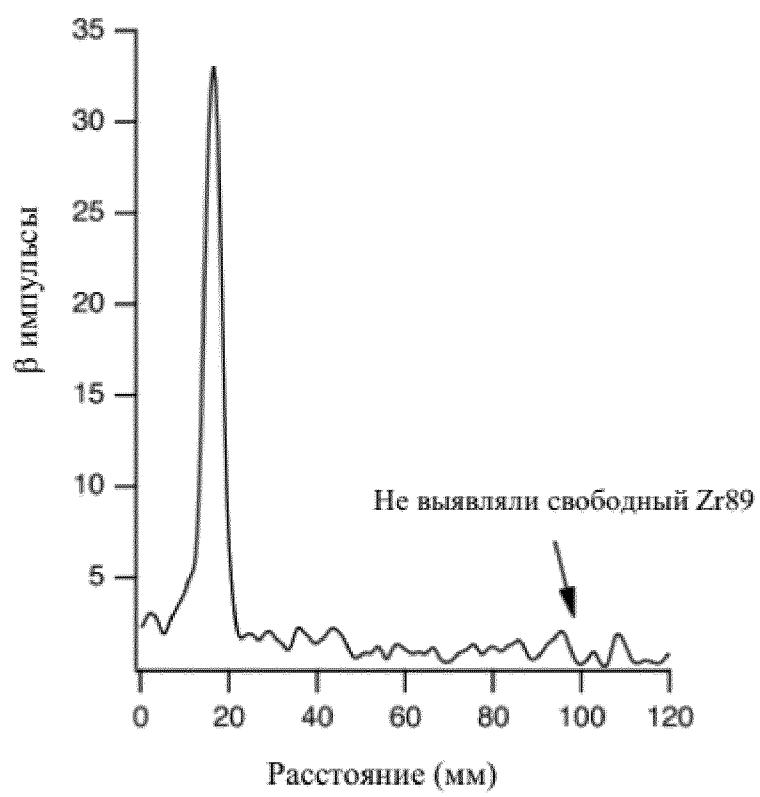
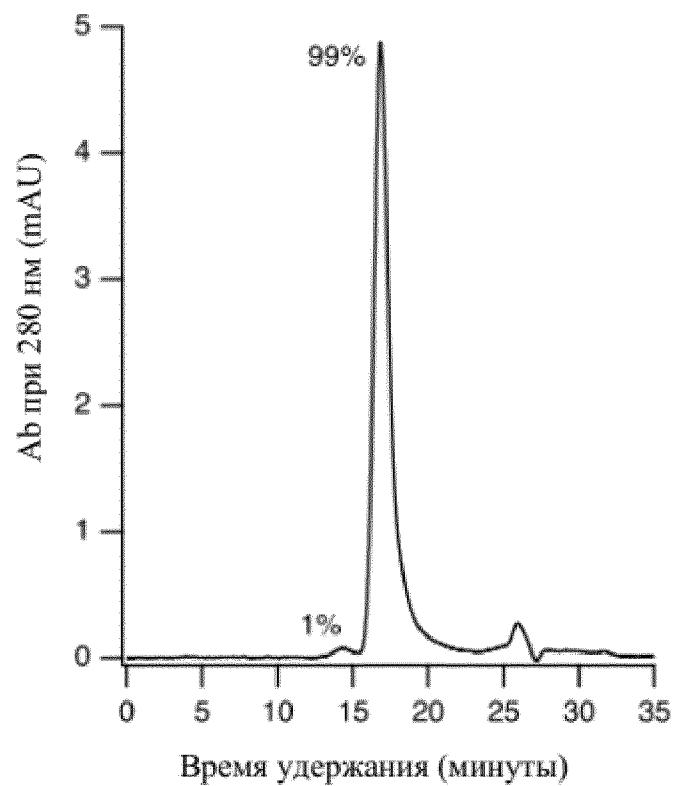
Фиг. 2В

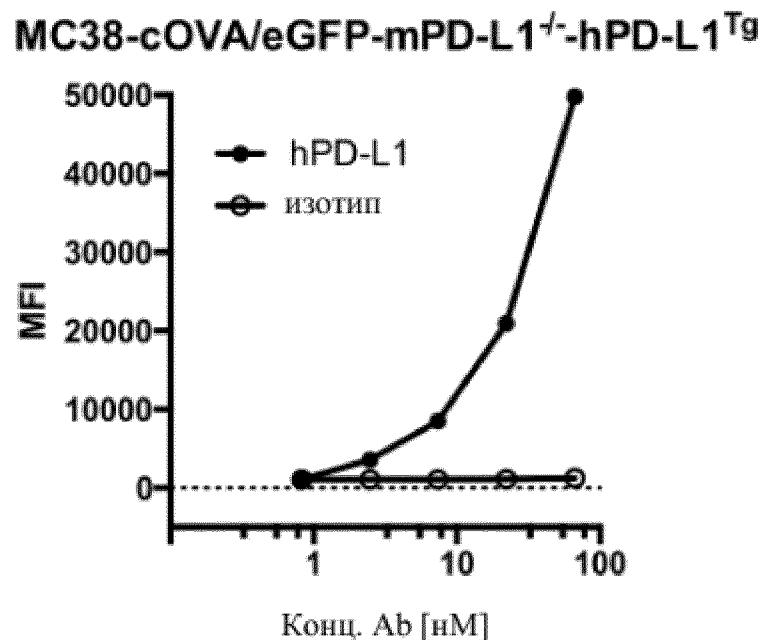


**Фиг. 3**

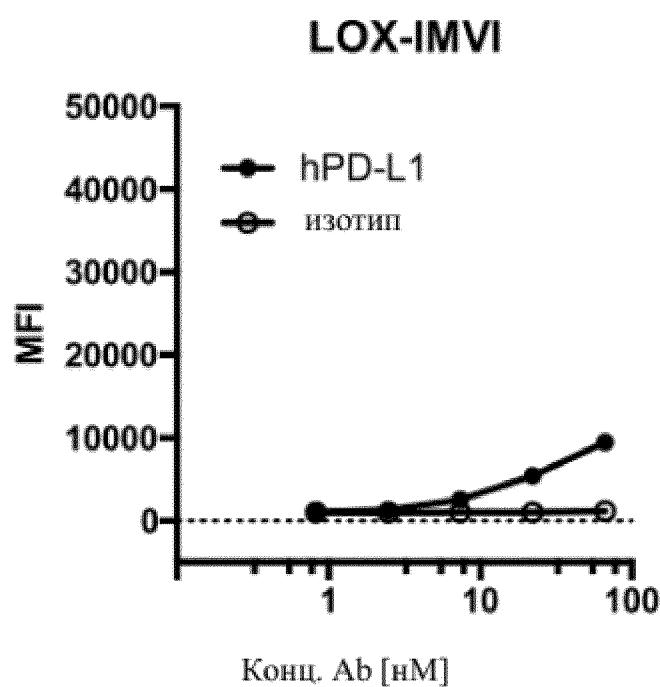


Фиг. 4

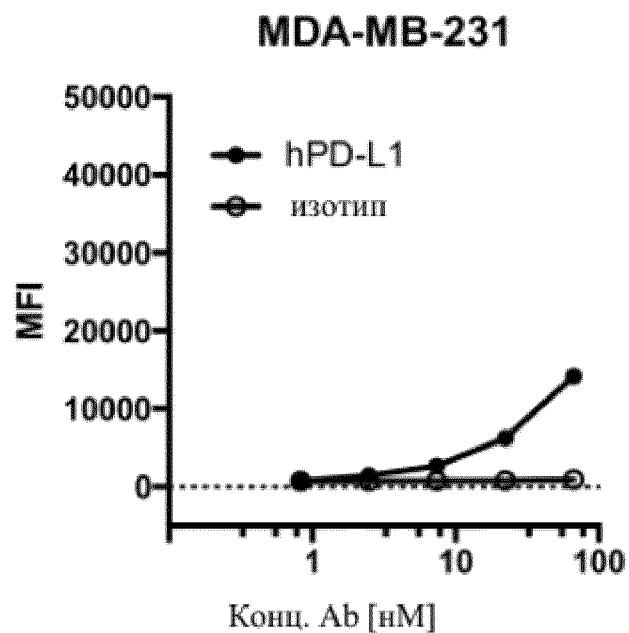
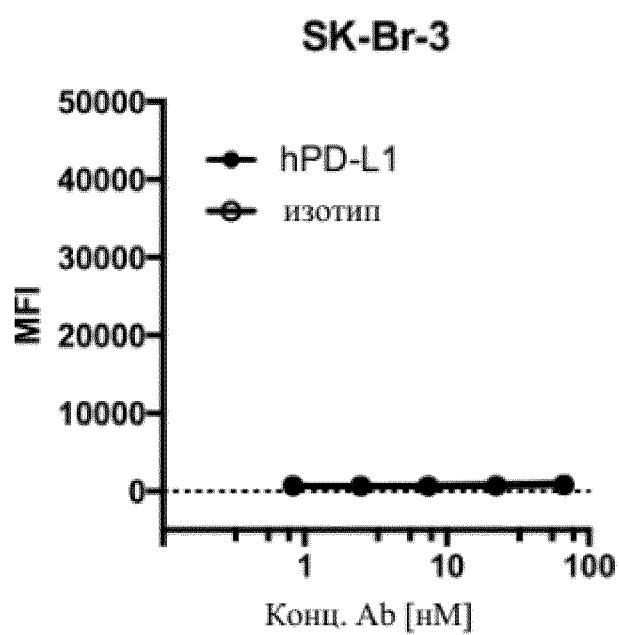
**Фиг. 5**



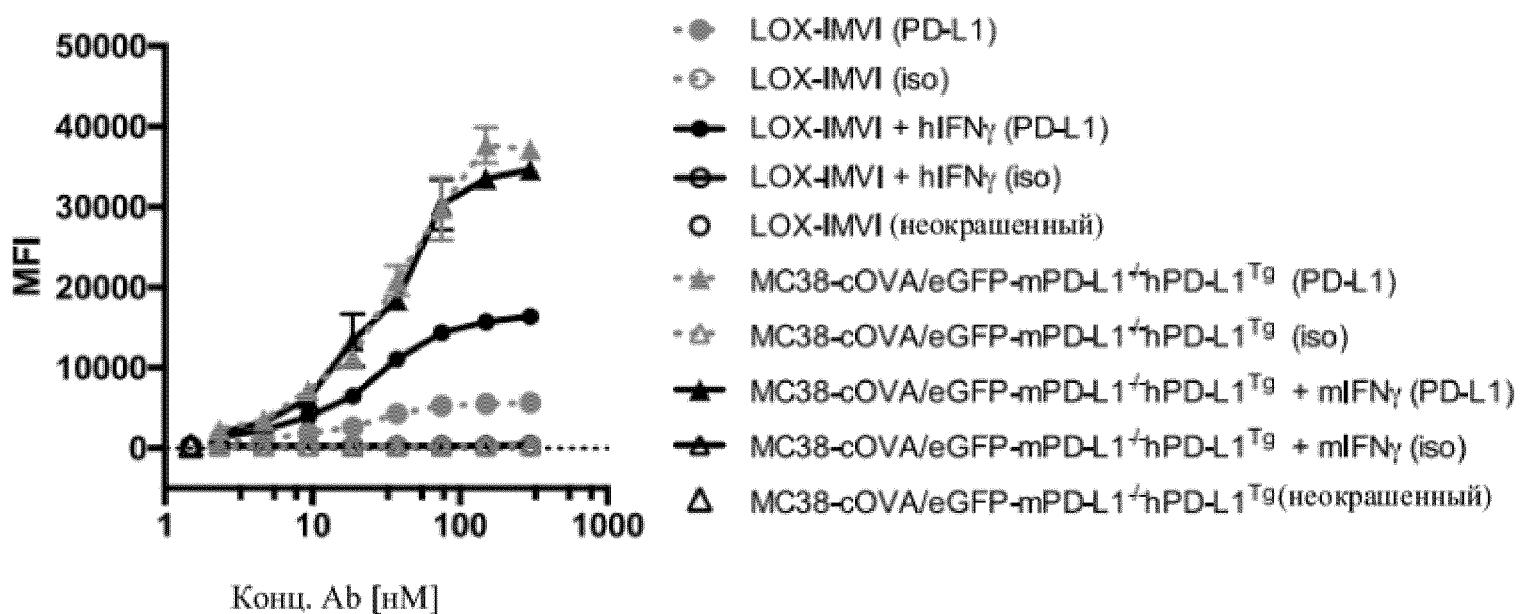
Фиг. 6А

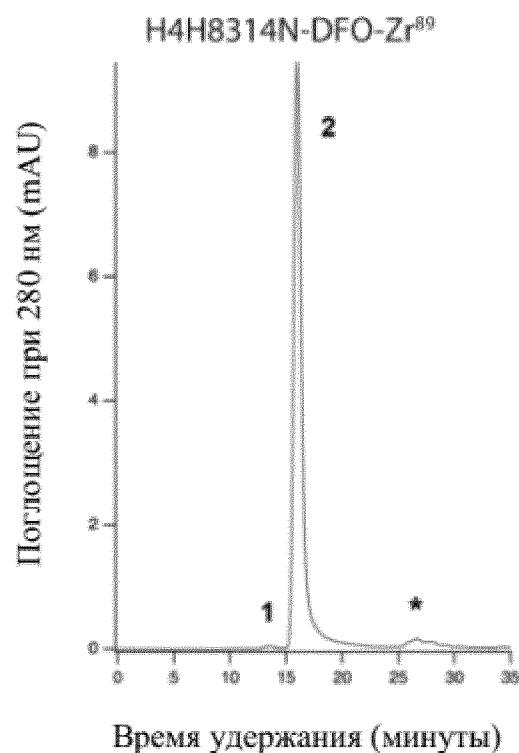
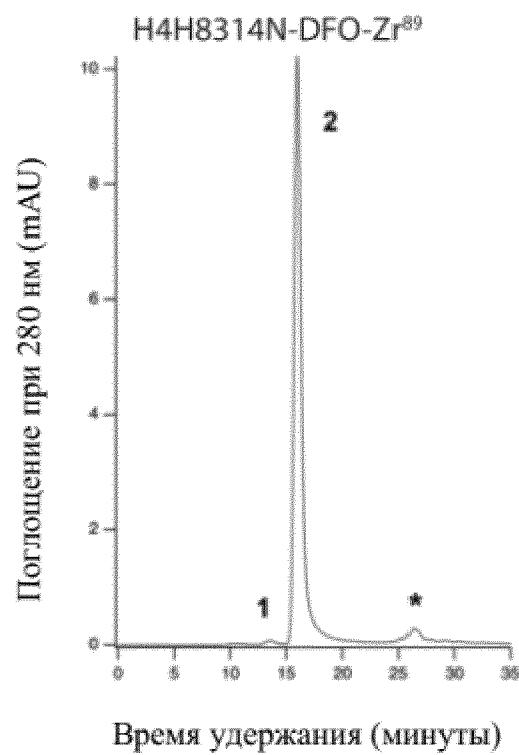


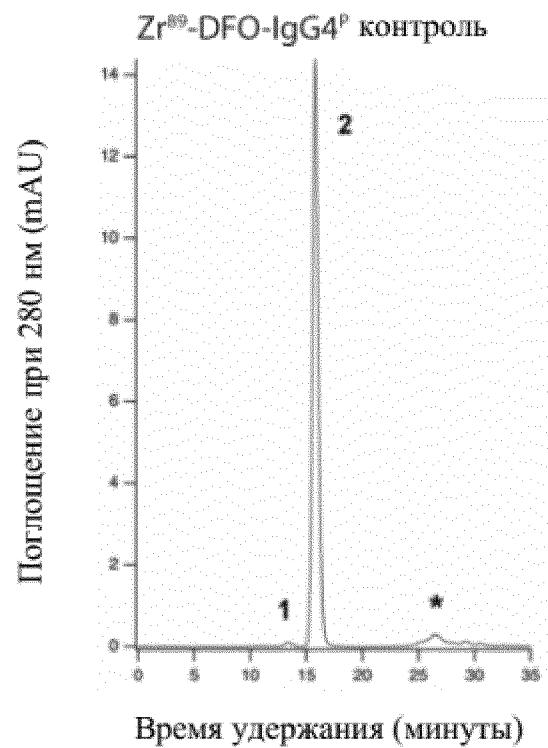
Фиг. 6В

**Фиг. 6C****Фиг. 6D**

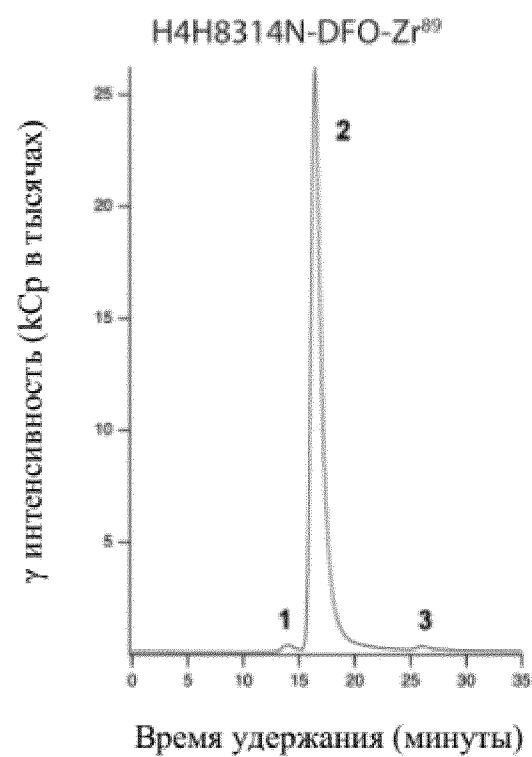
Фиг. 7



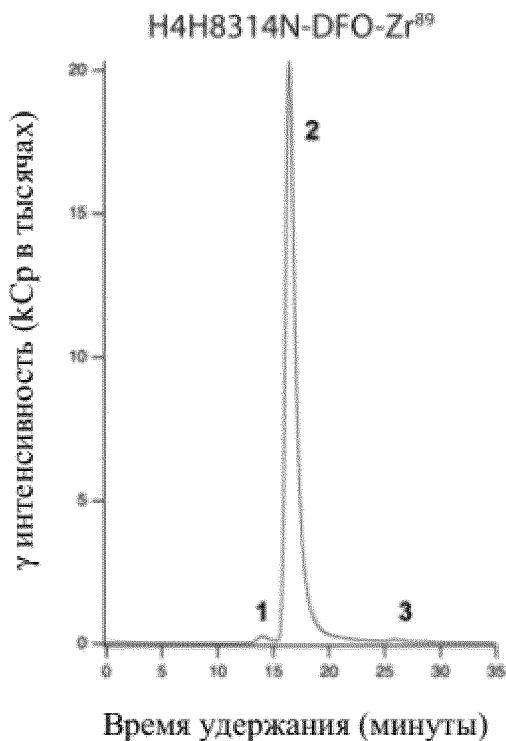
**Фиг. 8А****Фиг. 8В**



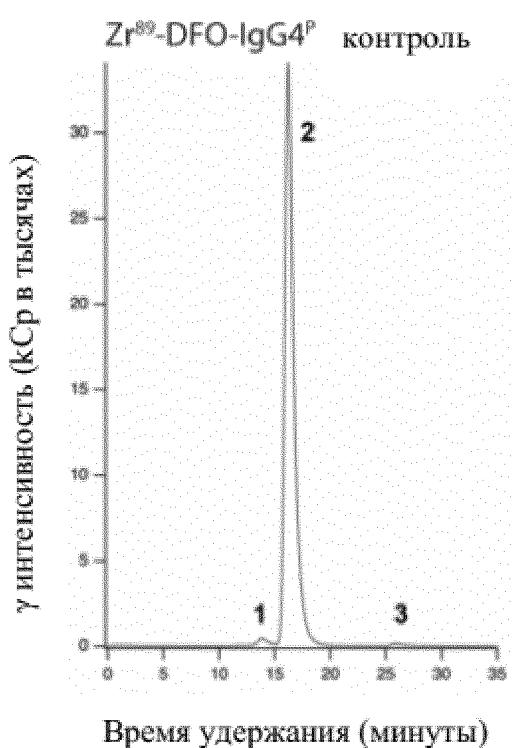
Фиг. 8С



Фиг. 8Д



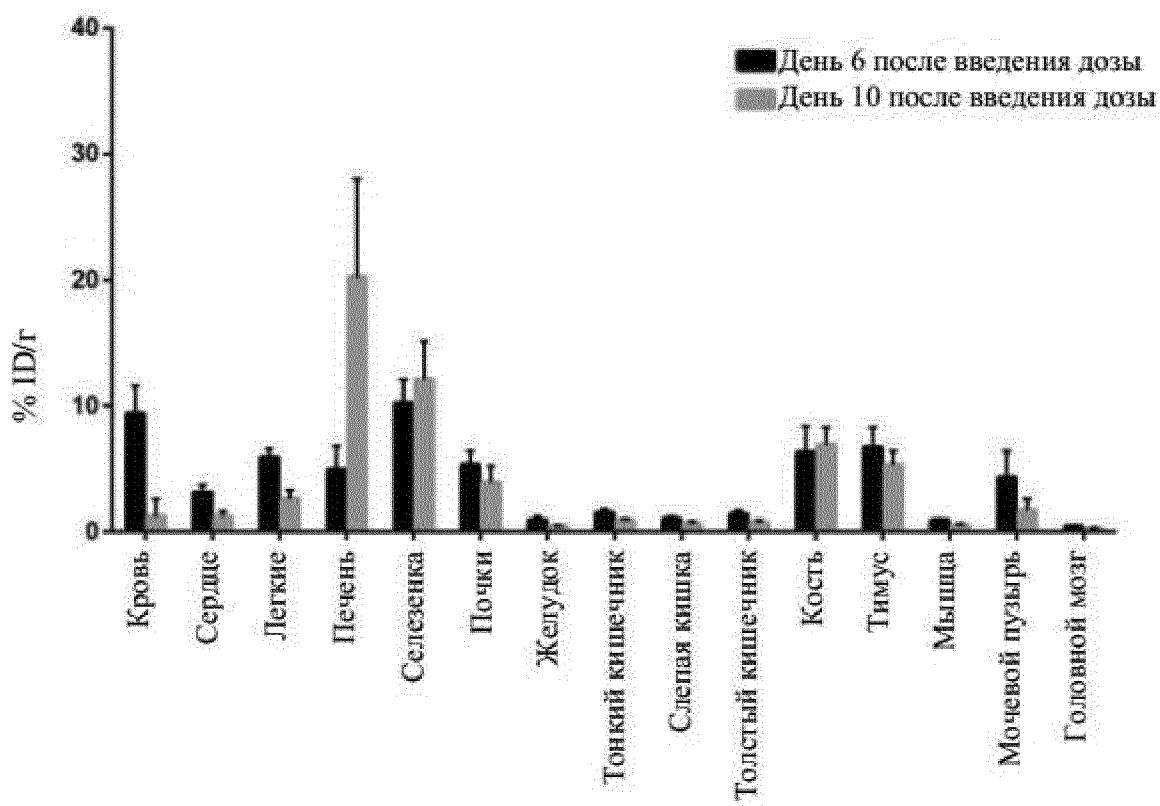
**Фиг. 8Е**



**Фиг. 8F**

Биораспределение H4H8314N-DFO-Zr<sup>89</sup>- в тканях, собранных

у мышей *PD-I<sup>huh/hu</sup>* *PD-L1<sup>huh/hu</sup>*



**Фиг. 9**