(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202091393 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.11.11

(22) Дата подачи заявки
2019.01.04

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(54) АНТИ-MCT1 АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

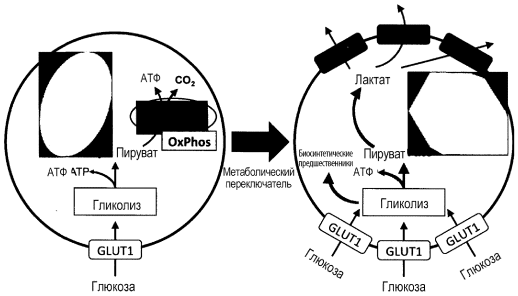
(31) **62/614,081; 62/703,223; 62/717,289; 62/719,364**
(32) **2018.01.05; 2018.07.25; 2018.08.10; 2018.08.17**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/012415**
(87) **WO 2019/136300 2019.07.11**
(88) **2019.09.26**

(71) Заявитель:
ИММЬЮНЕКСТ, ИНК.; АМГЕН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Ротштейн Джей, Кэрриер Кэтрин, Серегин Сергей (US), Гобейл Филип (CA), Ли Грейс Ки Джонг, Шигенака Кимберли П., Гордон Марсия, Куон Ким, Ван Юн, Леви Рафаэль Д., Ванг Джордон К., Чэмберс Росс, Такер Дэвид Фрэнсис, Скренчи Брэд А. (US)

(74) Представитель:
Парамонова К.В., Угрюмов В.М., Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М., Глухарёва А.О., Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В., Лыу Т.Н., Строкова О.В. (RU)

(57) Данное изобретение в целом относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, например гуманизированным, химерным и человеческим антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, и слитым белкам, композициям, содержащим такие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты и слитые белки, при этом такие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты и слитые белки специфически связываются с MCT1, например MCT1 человека или MCT1 не человека, и антагонизируют, ингибируют или блокируют одну или несколько MCT1-ассоциированных функций in vitro и/или in vivo. Данное изобретение также относится к терапевтическому и диагностическому применению этих анти-MCT1 антител, антигенсвязывающих фрагментов, слитых белков и композиций, содержащих, необязательно, при этом указанные анти-MCT1 антитела, антигенсвязывающие фрагменты, слитые белки и композиции, в терапевтических режимах, которые дополнительно включают введение других терапевтических агентов, например ингибиторов митохондрий и/или бигуанидов или ингибиторов MCT1 на основе малых молекул.



Покоящаяся Т-клетка **Активированная** Т-клетка

202091393 A1

202091393 A1

АНТИ-МСТ1 АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/613447, поданной 4 января 2018 года, предварительной заявке США № 62/684870, поданной 14 июня 2018 года, предварительной заявке США № 62/736025 США, поданной 25 сентября 2018 года и предварительной заявке США № 62/773630, поданной 30 ноября 2018 года. Содержание каждой из указанных предварительных заявок включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[2] Перечень последовательностей в файле под названием «43260.4213.txt», имеющем размер xxxxxx байтов, который был создан 4 января 2019 года, включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[3] Данное изобретение в целом относится к анти-МСТ1 антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, например, гуманизированным, химерным и человеческим антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, например, антагонистическим МСТ1-антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, и композициям, содержащим такие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Такие антитела и антигенсвязывающие фрагменты включают в себя такие, которые специфически связываются с МСТ1, например МСТ1, экспрессируемым на поверхности эндогенных экспрессирующих МСТ1 клеток человека, или рекомбинантных клеток, сконструированных для экспрессии МСТ1, и которые антагонизируют одну или несколько функций, ассоциированных с МСТ1, например, его способностью активировать транспорт лактата. Данное изобретение также относится к слитым или мультиспецифическим белкам, содержащим одну или несколько последовательностей, связывающих анти-МСТ1 антитела, например, мультиспецифические и биспецифические антитела. Данное изобретение также относится к терапевтическому и диагностическому применению таких антител, антигенсвязывающих фрагментов, слитых и мультиспецифических полипептидов и композиций, содержащих их. Данное

изобретение, в частности, относится к применению этих антител и их антигенсвязывающих фрагментов в качестве профилактических или терапевтических средств, например, для лечения аутоиммунного заболевания, воспаления, аллергии, трансплантанта, GVHD, рака и других патологических состояний, при которых подавление активности MCT1 и/или повышение числа/активности клеток TR1 и/или уменьшенные числа/активности Т-эффекторных клеток являются терапевтически предпочтительными.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[4] Транспортер питательного вещества монокарбоксилата SLC16A1 (MCT1) представляет собой трансмембранный белок несколько раз пересекающий мембрану, ответственный за облегченный транспорт критических метаболитов, в том числе продуктов гликолиза. MCT1 представляет собой члена одного из крупнейших семейств поверхностных мембранных белков, известных как белки-каналы растворенных веществ (SLC), в функции которых входит транспорт через мембраны критических клеточных питательных веществ, метаболитов, ионов, гормонов и липидов. MCT1 принадлежит к семейству транспортеров SLC16, пять из которых, как было показано, транспортируют монокарбоксилаты, такие как пируват, лактат и кетоны (**ссылки 34-36**) облегченным, pH-зависимым и двунаправленным образом. Было показано, что все из SLC16A1 (MCT1), SLC16A7 (MCT2), SLC16A8 (MCT3) и SLC16A3 (MCT4) транспортируют монокарбоксилаты с Km в диапазоне 1-40 мМ (**ссылка 37**). MCT1, MCT3 и MCT4 коэкспрессируются с Ig-доменом, содержащим поверхностный белок CD147 (басигин), который во многих клетках является критическим для соответствующей экспрессии клеточной поверхности (**ссылки 38, 37**). Помимо указанных MCT, другие транспортеры лактата включают в себя недавно охарактеризованный SLC16A11 (**ссылка 39**) и натрий-зависимые SLC5A8 и SLC5A12 (**ссылка 40**), AQP9 (**ссылки 41, 42**), а также SLC4A1 (полоса 3), экспрессируемые на эритроцитах. Таким образом, девять независимых белков могут контролировать и регулировать транспорт лактата в клетки, между клетками и из клеток по всему организму. MCT1 является особенно важным для транспорта лактата в Т- и В-клетках (**ссылка 43**).

[5] Иммунные клетки претерпевают изменения в своих метаболических потребностях на протяжении роста и требуют определенных метаболических

состояний для осуществления своих эффекторных функций. Блокирование гликолиза в моделях воспалительных заболеваний показало эффективность (**ссылка 53**). Например, развитие системной красной волчанки у склонных к заболеванию мышей предупреждается, когда лимфоциты блокируются в результате использования гликолитического пути после активации (**ссылка 53**). Действительно, отсутствие продуцирования ИФНγ в указанных моделях согласуется с предыдущими сообщениями, в которых показано, что гликолиз необходим для продуцирования ИФНγ (**ссылка 54**). Блокирование экспорта лактата уменьшает поток через гликолитический путь (**ссылка 55**) и, в результате изменения Myc, может отклонить Т-клетки от осуществления эффекторных функций (**ссылка 56**). Ингибирование функции MCT1 блокирует активность эффекторных Т-клеток в некоторых животных моделях заболеваний, в том числе индуцированного коллагеном артрита, отторжения аллотрансплантата и GVHD (**ссылки 45, 47, 50, 57-59**).

[6] В то же время, повсеместное распространение указанных путей в неиммунных клетках и отсутствие иммуноспецифических мишеней предупреждали терапевтическое вмешательство. Учитывая широкую экспрессию MCT во многих тканях, подходы на основе малых молекул, которые поражают множественные MCT, создают особые проблемы, в том числе токсичность для тканей. Например, AZ3965 представляет собой малую молекулу, которая связывается с MCT1 и MCT2 (**ссылки 45, 46**). Указанный ингибитор MCT1/2 на основе малой молекулы имел потенциальное применение при лечении аутоиммунного заболевания/трансплантата (**ссылка 47**), однако неизбирательное связывание приводило к токсичности для сетчатки, сердца и семенника в доклинических моделях (**ссылки 48, 85**).

[7] Взрослые люди с недостаточностью MCT1 являются здоровыми (**ссылка 49, 68**). Индивидуумы, гомозиготные по мутациям потери функции MCT1 (LOF), были выявлены только в условиях стресса (инфекция, голодание) вследствие изменений в использовании и метаболизме кетонов. У детей проявляются нарушения утилизации кетонов и иногда непереносимость физической нагрузки. Указанные различные симптомы исчезали с возрастом, возможно, вследствие роста скелетной мышечной массы в подростковом возрасте. Гетерозиготные члены семьи индивидуумов, гомозиготных по мутациям MCT1, не имели истории кетоацидоза, что позволяет предположить, что мутации LOF вызывают

кетоацидоз только в сочетании с дополнительными генетическими/экологическими факторами (**ссылка 68**). Вне иммунной системы МСТ1 экспрессируется во многих органах, в том числе скелетных мышцах, почке, печени, семеннике, сердце и головном мозге наряду с другими МСТ. Отсутствие широкой токсичности у индивидуумов с мутациями МСТ1, вероятно, связано со значительной избыточностью МСТ. Например, все из МСТ1, МСТ2 и МСТ4 экспрессируют в сетчатке (**ссылка 69**), и у индивидуумов с недостаточностью МСТ1 нарушений сетчатки не наблюдалось, что свидетельствует о функциональной избыточности. В настоящее время у индивидуумов с недостаточностью МСТ1 явных иммунодефицитов не наблюдалось. Помимо этого, люди с недостаточностью МСТ1 не имеют дисфункции эритроцитов.

[8] Между раковыми и нормальными клетками существуют метаболические различия: в частности, опухолевые клетки полагаются на высокий уровень аэробного гликолиза, а не на окислительное фосфорилирование, чтобы вырабатывать энергию для поддержания клеточных функций. Действительно, у раковых клеток скорость гликолиза увеличивается в 60 раз по сравнению с нормальными клетками, даже при достаточном количестве кислорода. Указанная зависимость от гликолиза и его последствий называется «эффектом Варбурга» (**ссылки 94, 95**). Злокачественные клетки являются высокоанаболичными и требуют очень высоких уровней питательных веществ, АТФ и строительных блоков для синтеза компонентов, необходимых для их роста и выживания. Использование гликолитического пути обеспечивает АТФ, но также стимулирует образование лактата, который образуется из пирувата в конце гликолитического пути. Массивное образование лактата опухолевой клеткой требует эффективных средств для его потребления или элиминации, чтобы предупредить внутриклеточное подкисление раковой клетки.

[9] Одним из способов поддержания гомеостаза лактата является использование транспортеров монокарбоксилата. Исследования профилирования экспрессии показали, что большинство агрессивных типов опухолей экспрессируют заметно повышенные уровни МСТ1, МСТ4 или и того и другого (**ссылка 96**). Экспрессия МСТ1 и МСТ4 регулируется двумя основными онкогенными факторами транскрипции, MYC и индуцируемым гипоксией фактором-1а (HIF-1a), соответственно (**ссылки 96, 97**), которые управляют заметным повышением образования ключевых белков, которые поддерживают

аэробный гликолиз, в том числе переносчиков аминокислот и ферментов, участвующих в катаболизме глютамина и глюкозы (**ссылка 98**). Злокачественные новообразования с вовлечением MYC и гипоксические опухоли, как правило, устойчивы к современным видам терапии первой линии, при этом имеют место высокие частоты неэффективности лечения, рецидивов и высокой смертности пациентов (**ссылки 99, 100**). Важно отметить, что ингибирование MCT1 может приводить к уничтожению опухолевых клеток *ex vivo* и провоцировать регрессию опухоли *in vivo*, а их эффективность усиливается такими агентами, как метформин, которые придают раковой клетке гликолитический фенотип (**ссылки 96, 100**).

[10] MCT1 обычно экспрессируется при очень низких уровнях в островках поджелудочной железы и, в частности, в бета-клетках (**ссылки 101, 102**). Это, вероятно, объясняет очень медленное поглощение лактата этими клетками. Отличительной чертой индуцированного физическими упражнениями гиперинсулинизма (EIHI - exercise-induced hyperinsulinism) является несоответствующая секреция инсулина после энергичной физической активности, которая приводит к гипогликемии (**ссылка 103**). EIHI был ассоциирован с повышенной экспрессией MCT1 в бета-клетках и у трансгенных мышей, сконструированных для сверхэкспрессии MCT1, частично демонстрирующих многие из признаков EIHI (**ссылка 104**).

[11] Как описано выше, были разработаны различные ингибиторы MCT на основе малых молекул, однако многие из этих ингибиторов на основе малых молекул не обладают специфичностью к MCT1, что приводит к нецелевым видам токсичности. Несмотря на эти недостатки, было показано, что ингибиторы MCT1 на основе малых молекул блокируют метаболизм, пролиферацию и выживание опухолевых клеток, а также ухудшают онкогенный потенциал *in vivo* в опухолях с высокой экспрессией MCT1 (**ссылка 96**). Противоопухолевые эффекты таких ингибиторов MCT1 на основе малых молекул усиливаются совместным введением бигуанида метформина, который, как полагают, дополнительно повышает зависимость опухолевых клеток от аэробного гликолиза и, таким образом, увеличивает потребность в MCT1-опосредованном оттоке лактата (**ссылка 96**). В то же время до настоящего времени не сообщалось ни о каких антителах, которые связываются с MCT1, экспрессируемым на поверхности, например, об антителах, которые связываются с MCT1, экспрессируемым на поверхности эндогенных или

сконструированных экспрессирующих МСТ1 клетках человека или клетках, не относящихся к человеку. Более того, насколько известно заявителям, в литературе не сообщалось о каких-либо функциональных антителах, т.е., антителах, которые связываются с МСТ1 и тем самым антагонизируют, ингибируют или блокируют эффекты МСТ1.

КРАТКАЯ СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[12] Впервые в данном изобретении предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с МСТ1 человека, экспрессируемым на поверхности эндогенных или рекомбинантных клеток, экспрессирующих МСТ1, например, клеток человека, антитела которых, помимо этого, являются функциональными, т.е., такие антитела антагонизируют функции, связанные с МСТ1.

[13] Более конкретно, данное изобретение относится к новым антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с МСТ1 человека, которые антагонизируют связанные с МСТ1 функции, такие как ингибирование МСТ1-опосредованного транспорта лактата.

[14] Данное изобретение дополнительно относится к МСТ1-связывающим слитым белкам и МСТ1-связывающим мультиспецифическим полипептидам, которые содержат один или несколько вариабельных доменов связывающего МСТ1 антитела и необязательно другие фрагменты, например, другой полипептид, такой как другой антигенсвязывающий вариабельный домен, цитокин или рецептор.

[15] Данное изобретение дополнительно относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с одним или несколькими остатками, содержащимися во внеклеточном домене или области МСТ1 человека или не человека.

[16] Данное изобретение дополнительно относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с МСТ1 человека или не человека, который антагонизирует, ингибирует или блокирует одну или несколько функций, связанных с МСТ1, например, in vitro и/или in vivo.

[17] Данное изобретение дополнительно относится к выделенному антителу или антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с не относящимся к человеку МСТ1, например, грызуна, таким как МСТ1 мыши или крысы, который

необязательно антагонизирует, ингибирует или блокирует одну или несколько функций, связанных с MCT1, например, in vitro и/или in vivo, например, который необязательно дополнительно связывается с MCT1 человека.

[18] Данное изобретение дополнительно относится к выделенному анти-MCT1 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который конкурирует за связывание с MCT1 человека или не человека, как любое из антител против MCT1 человека Ат1-Ат95.

[19] В данном изобретении дополнительно представлены выделенные анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тем же самым или перекрывающимся эпитопом на MCT1 человека, что и любое одно из антител против MCT1 человека Ат1-Ат95.

[20] В данном изобретении дополнительно представлены выделенные анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с эпитопом на MCT1 человека, выбранным из следующего:

(i) эпитопа, который содержит один или несколько остатков T41, E46, S285, S286, Y287, K289, H292, Y293, K297, G417, I47 и D418;

(ii) эпитопа, который содержит, по меньшей мере, три остатка, в котором, по меньшей мере, один, два или все три из указанных остатков содержат остаток, выбранный из T41, E46, S285, S286, Y287, K289, H292, Y293, G417, I47 и D418;

(iii) эпитопа, который содержит три остатка, в котором, по меньшей мере, один, два или все три из указанных остатков содержат T41, E46, S285, S286, Y287, K289, H292, Y293, G417, I47 и D418;

(iv) эпитопа, который содержит от трех до шести остатков, в котором, по меньшей мере, один, два, три, четыре, пять или все шесть из указанных остатков содержат T41, E46, S285, S286, Y287, K289, H292, Y293, G417, I47 и D418;

(v) эпитопа, который содержит, по меньшей мере, один, два или все три остатка T41, S285 и S286;

(vi) эпитопа, который содержит T41;

(vii) эпитопа, который содержит S286;

(viii) эпитопа, который содержит S285;

(ix) эпитопа, который содержит H292;

(x) эпитопа, который содержит остатки T41, S285, S286, Y287, G417, и D418;

(xi) эпитопа, который содержит остатки T41, S285 и S286;

(xii) эпитопа, который содержит остатки T41, I47, S285, S286, G417 и D418;

(xiii) эпитопа, который содержит остатки E46, K289 и H292;

(xiv) эпитопа, который содержит остатки K297, Y293 и H292;

(xv) эпитопа, который содержит один или несколько соответствующих остатков не относящегося к человеку MCT1, например, выбранного из принадлежащего грызуну (например, мыши, крысе, морской свинке), кролику, цыпленку, не относящегося к человеку примату (например, яванскому макаку, шимпанзе, орангутану), корове, овце, собаке и кошке;

при этом необязательно остатки, присутствующие в указанном эпитопе, идентифицируют с использованием сканирования аланином.

[21] Данное изобретение дополнительно относится к выделенным анти-MCT1 антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с эпитопом на MCT1 человека, выбранном в соответствии с п. 7, при этом указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно взаимодействует с одним или несколькими из следующих остатков:

(i) одним или несколькими из остатков P37, I40, K45, E48 и T55 (петля 1);

(ii) остатком Q111 (петля 2);

(iii) остатком Q166 (петля 3);

(iv) одним или несколькими из остатков L284, E296, S298 (петля 4);

(v) остатком Y353 (петля 5);

(vi) одним или несколькими из остатков Y419, T422 (петля 6); и/или

(vii) любой комбинацией вышеизложенного.

[22] В данном изобретении дополнительно представлены выделенные анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с эпитопом на на MCT1 не человека, при этом MCT1 не человека необязательно выбирают из принадлежащего грызуну (например, мыши, крысе, морской свинке), кролику, птице (например, цыпленку, индейке, гусю), не человекообразному примату (например, яванской макаке, шимпанзе, орангутану), корове, овце, собаке, кошке, при этом необязательно указанный эпитоп на MCT1 не человека содержит один или несколько соответствующих остатков в MCT1 не человека, как один или несколько из T41, S285, S286, Y287, G417, I47 и D418 MCT1 человека, например, которые антагонизируют, ингибируют или блокируют одну или несколько активностей указанного не относящегося к человеку MCT1, например, *in vitro* и/или *in vivo*.

[23] В данном изобретении дополнительно представлены выделенные анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые являются человеческими, гуманизированными, принадлежащими не относящимися к человекоподобному примату, приматизированными, принадлежащими цыпленку, грызуну, или химерными.

[24] В данном изобретении дополнительно представлены выделенные анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют опосредованный MCT1 человека транспорт лактата, например, in vitro и/или in vivo.

[25] В данном изобретении дополнительно представлены выделенные анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с эндогенными экспрессирующими MCT1 клетками и/или связываются с рекомбинантными или сконструированными экспрессирующими MCT1 клетками, например, экспрессирующими MCT1 человека клетками 293.

[26] В данном изобретении дополнительно представлены выделенные анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбирают из группы, состоящей из человеческого или гуманизированного моноклонального антитела; моноспецифического антитела; полиспецифического антитела; мультиспецифического антителоподобного полипептида, гуманизированного антитела; человеческого или гуманизированного тетрамерного антитела;

человеческого или гуманизированного четырехвалентного антитела; человеческого или гуманизированного мультиспецифического антитела; одноцепочечного антитела; домен-специфического антитела; однодоменного антитела; антитела с удаленным доменом; слитого белка scFc; химерного антитела; синтетического антитела; рекомбинантного антитела; гибридного антитела; мультиспецифического антитела, биспецифического антитела, ByTE, мутированного антитела; CDR-привитых антител; фрагмента антитела; Fab; F(ab')2; Fab′-фрагмента; Fv-фрагмента; одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv); Fd-фрагмента; фрагмента dAb; диател; нанотел; бивалентного нанотела; антитела VHH; и минитела.

[27] В данном изобретении дополнительно представлены выделенные анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые представляют собой гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты.

[28] В данном изобретении дополнительно представлены выделенные анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 CDR любого из анти-MCT1 антител Ат1-Ат95, при этом необязательно указанные CDR определены по Кабату (Kabat) по Чотиа (Chothia) и Леску (Lesk), или выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует за связывание с MCT1 или который связывает тот же самый эпитоп с любым из анти-MCT1 антител Ат1-Ат95, или аффинно-зрелый вариант любого из вышеизложенного.

[29] В данном изобретении дополнительно представлены выделенные анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые являются гуманизированными, которые содержат те же самые CDR любого из анти-MCT1 антител Ат1-Ат95, при этом необязательно указанные CDR определены по Кабату или по Чотиа и Леску.

[30] В данном изобретении дополнительно представлены выделенные анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат тот же самый полипептид VH, который содержится в анти-MCT1 антителе, выбранном из Ат1-Ат95, или его гуманизированный вариант.

[31] В данном изобретении дополнительно представлены выделенные анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат тот же самый полипептид VL, который содержится в анти-MCT1 антителе, выбранном из Ат1-Ат95, или его гуманизированный вариант.

[32] В данном изобретении дополнительно представлены выделенные анти-МСТ1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат полипептид VH и полипептид VL, которые являются идентичными полипептидам, содержащимся в анти-МСТ1 антителе, выбранном из Ат1-Ат95, или его гуманизированный вариант.

[33] В данном изобретении дополнительно представлены выделенные анти-МСТ1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат полипептид вариабельного домена тяжелой цепи и/или полипептид вариабельного домена легкой цепи соответственно, имеющие, по меньшей мере, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с полипептидом вариабельного домена тяжелой цепи и/или полипептидом вариабельного домена легкой цепи, содержащимся в любом из анти-МСТ1 антител Ат1-Ат95.

[34] В данном изобретении дополнительно представлены выделенные анти-МСТ1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат полипептиды CDR1, 2 и 3 VH соответственно, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4-6, и полипептиды CDR1, 2 и 3 VL соответственно, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7-9.

[35] В данном изобретении дополнительно представлены выделенные анти-МСТ1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые представляют собой гуманизированное анти-МСТ1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, происходящий из любого из Ат1-Ат95, необязательно содержащий такие же CDR, как любое из Ат1-Ат95, при этом необязательно указанные CDR определены по Кабату или по Чотиа и Леску.

[36] В данном изобретении также представлены аффинно-зрелые анти-МСТ1 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, происходящие из любого из Ат1-Ат95, при этом не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 остатков CDR мутированы относительно остатков CDR, которые содержатся в 6 полипептидах CDR любого из Ат1-Ат95, при этом необязательно указанное аффинно-зрелое анти-МСТ1 антитело связывается с МСТ1 человека, по меньшей мере, с такой же самой или более высокой аффинностью, что и анти-МСТ1 антитело, из которого оно происходит, и/или аффинно-зрелое антитело или антигенсвязывающий фрагмент антагонизирует МСТ1 человека, например, in vitro и/или in vivo, при этом необязательно указанные CDR определены по Кабату или по Чотиа и Леску

необязательно, при этом не более 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 остатков CDR мутированы относительно полипептидов CDR любого из Ат1-Ат95 или не более 1, 2, 3 или 4 остатков CDR мутированы относительно полипептидов CDR любого из Ат1-Ат95 или не более 1 или 2 остатков CDR мутированы относительно полилипептидов CDR любого из Ат1-Ат95.

[37] В данном изобретении дополнительно представлено Антитело против MCT1 человека или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вышеизложенного, который дополнительно связывается с не относящимся к человеку MCT1, необязательно грызуна, кролика, цыпленка или не человекообразного примата MCT1.

[38] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела, содержащие полипептиды VH и VL SEQ ID NO: 2 и 3; SEQ ID NO: 12 и 13; SEQ ID NO: 14 и 15; SEQ ID NO: 16 и 17; или антитело, содержащее полипептиды VL и/или VH любого из антител Ат5-Ат95, или содержащее гуманизированные или аффинно-зрелые варианты полипептидов VL и/или VH любого из антител Ат5-Ат95.

[39] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, содержащие полипептид вариабельного домена тяжелой цепи или полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 12, 14, 16, 19-32, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153 и 155; и полипептид вариабельного домена легкой цепи или полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 3, 13, 15, 17, 33-44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154 и 156.

[40] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, содержащие полипептид вариабельного домена тяжелой цепи и полипептид вариабельного домена легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, соответственно выбранную из следующего: SEQ ID NO: 2 и 3; SEQ ID NO: 12 и 13; SEQ ID NO: 14 и 15; SEQ ID NO: 16 и 17; SEQ ID NO: 45 и 46; SEQ ID NO: 47 и 48; SEQ ID NO: 49 и 50; SEQ ID NO: 51 и 52;

SEQ ID NO: 53 и 54; SEQ ID NO: 55 и 56; SEQ ID NO: 57 и 58; SEQ ID NO: 59 и 60; SEQ ID NO: 61 и 62; SEQ ID NO: 63 и 64; SEQ ID NO: 65 и 66; SEQ ID NO: 67 и 68; SEQ ID NO: 69 и 70; SEQ ID NO: 71 и 72; SEQ ID NO: 73 и 74; SEQ ID NO: 75 и 76; SEQ ID NO: 77 и 78; SEQ ID NO: 79 и 80; SEQ ID NO: 81 и 82; SEQ ID NO: 83 и 84; SEQ ID NO: 85 и 86; SEQ ID NO: 87 и 88; SEQ ID NO: 89 и 90; SEQ ID NO: 91 и 92; SEQ ID NO: 93 и 94; SEQ ID NO: 95 и 96; SEQ ID NO: 97 и 98; SEQ ID NO: 99 и 100; SEQ ID NO: 101 и 102; SEQ ID NO: 103 и 104; SEQ ID NO: 105 и 106; SEQ ID NO: 107 и 108; SEQ ID NO: 109 и 110; SEQ ID NO: 111 и 112; SEQ ID NO: 113 и 114; SEQ ID NO: 115 и 116; SEQ ID NO: 117 и 118; SEQ ID NO: 119 и 120; SEQ ID NO: 121 и 122; SEQ ID NO: 123 и 124; SEQ ID NO: 125 и 126; SEQ ID NO: 127 и 128; SEQ ID NO: 129 и 130; SEQ ID NO: 131 и 132; SEQ ID NO: 133 и 134; SEQ ID NO: 135 и 136; SEQ ID NO: 137 и 138; SEQ ID NO: 139 и 140; SEQ ID NO: 141 и 142; SEQ ID NO: 143 и 144; SEQ ID NO: 145 и 146; SEQ ID NO: 147 и 148; SEQ ID NO: 149 и 150; SEQ ID NO: 151 и 152; SEQ ID NO: 153 и 154 и SEQ ID NO: 155 и 156.

[41] В данном изобретении дополнительно представлены гуманизированные и/или аффинно-зрелые анти-MCT1 антитела или антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, которые содержат полипептид VL, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 3, 13, 15, 17 и 33-44 или аминокислотной последовательности любого из антител Ат5-Ат60.

[42] В данном изобретении дополнительно представлены гуманизированные анти-MCT1 антитела или антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, которые содержат полипептид VH, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2, 12, 14, 16 и 19-32 или аминокислотной последовательности любого из антител Ат5-Ат60.

[43] В данном изобретении дополнительно представлены гуманизированные анти-MCT1 антитела или антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с любым из предыдущего, которые содержат полипептид VL, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 13, 15, 17 и 33-44, и полипептид VH, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 12, 14, 16 и 19-32 или аминокислотной последовательности любого из антител Ат5-Ат60.

[44] В данном изобретении дополнительно представлены гуманизированные анти-MCT1 антитела или антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с любым из предыдущего, которые содержат полипептид VL, имеющий последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 3, 13, 15, 17, 33-44, или по отношению к полипептиду VL, содержащемуся в любом из антител Ат5-Ат95.

[45] В данном изобретении дополнительно представлены гуманизированные анти-MCT1 антитела или антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с любым из предыдущего, которые содержат полипептид VH, имеющий последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или 100% идентичность последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 2, 12, 14, 16, 19-32, или по отношению к полипептиду VH, содержащемуся в любом из антител Ат5-Ат95.

[46] В данном изобретении дополнительно представлены гуманизированные анти-MCT1 антитела или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущего, которые содержат полипептид VL, имеющий последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 3, 13, 15, 17, 33-44 или по отношению к полипептиду VL, содержащемуся в любом из антител Ат5-Ат95, и/или полипептид VH, имеющий последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или 100% идентичность последовательности по отношению к полипептиду VH SEQ ID NO: 2, 12, 14, 16, 19-32 или по отношению к полипептиду VH, содержащемуся в любом из антител Ат5-Ат95.

[47] В данном изобретении дополнительно представлено гуманизированное анти-MCT1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущего, при этом последовательность CDR3 тяжелой цепи содержит 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 аминокислотных остатка.

[48] В данном изобретении дополнительно представлено гуманизированное анти-MCT1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущего, при этом последовательность CDR3 тяжелой цепи содержит 21, 22, 23 или 24 аминокислотных остатка.

[49] В данном изобретении дополнительно представлены выделенное анти-MCT1 человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущего, при этом последовательность CDR3 тяжелой цепи является идентичной SEQ ID NO: 6 или отличается от нее не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток, необязательно при этом указанные различия, если они присутствуют, включают в себя консервативные аминокислотные замены или содержат замещающие аминокислоты, которые преобладают в том же самом положении в CDR3 тяжелой цепи антител человека или грызунов, содержащих CDR3 той же самой длины.

[50] В данном изобретении дополнительно представлены выделенное анти-MCT1 человеческое или гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущего, который конкурирует за связывание с MCT1 с референтным антителом, при этом референтное антитело выбирают из Ат1-Ат95.

[51] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 человека антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащим те же самые полипептиды CDR вариабельного домена тяжелой цепи и/или вариабельного домена легкой цепи, что и антител против MCT1 человекао, выбранное из Ат1-Ат95.

[52] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела, содержащие полипептиды вариабельного домена тяжелой цепи и/или вариабельного домена легкой цепи антитела, выбранного из Ат1-Ат95.

[53] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 человеческие или гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с любым из вышеизложенного, которые содержат константные области тяжелой и/или легкой цепи, необязательно константные области тяжелой и/или легкой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, константная (константные) область (области) которых необязательно мутируют для ослабления или усиления, по меньшей мере, одной эффекторной функции, например, при этом указанные эффекторные функции включают в себя связывание FcR, связывание комплемента, функцию ADCC, связывание FcRN и гликозилирование.

[54] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущего,

при этом CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента образуют аналогичную трехмерную структуру антитела, аналогичную или такую же самую, что и CDR Ат1, как указано положениями альфа-углеродов в соответствующих CDR, отличающимися средним среднеквадратичным отклонением (RMSD), составляющим менее чем 2,0 Å, менее чем 1,0 Å или менее чем 0,5 Å, как определятся с помощью структурного выравнивания.

[55] В данном изобретении дополнительно представлены гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие последовательности CDR вариабельного домена тяжелой цепи Ат1 (SEQ ID NOS: 4, 5, 6) и последовательности CDR вариабельного домена легкой цепи Ат1 (SEQ ID NO: 7, 8, 9).

[56] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие домен VH, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена VH Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 2); и содержащие домен VL, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена VL Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 3).

[57] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, которые содержат константные домены человека, необязательно IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, дополнительно необязательно модифицированные для усиления, по меньшей мере, одной эффекторной функции Fc, выбранной из гликозилирования, связывания FcR, связывания FcRN, связывание комплемента и функции ADCC.

[58] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, который содержит константные области IgG1 человека, необязательно модифицированные для уменьшения связывания FcR и/или связывания комплемента, дополнительно необязательно включающие

мутации E269R и/или K322A, и/или указанные константные области IgG1 человека содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

[59] В данном изобретении дополнительно представлены слитые полипептиды, химерные антигенные рецепторы (CAR), мультиспецифические антигенсвязывающие полипептиды или полипептиды мультиспецифических или биспецифических антител, содержащие, по меньшей мере, одно анти-MCT1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из вышеизложенного.

[60] В данном изобретении дополнительно представлено анти-MCT1 антитело или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифического или биспецифического антитела по любому из предыдущих вариантов осуществления, которые снижают активность Т-эффекторных клеток и/или количество Т-эффекторных клеток, например, CD3+, CD4+ или CD8+ Т-эффекторных клеток.

[61] В данном изобретении представлены анти-MCT1 антитела или слитые полипептиды, химерные антигенные рецепторы (CAR), мультиспецифические антигенсвязывающие полипептиды или полипептиды мультиспецифических или биспецифических антител по любому из предыдущих вариантов осуществления, которые повышают активность и/или количество Tr1-клеток.

[62] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела или слитые полипептиды, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифического или биспецифического антитела по любому из предыдущих вариантов осуществления, которые снижают активность эффекторных Т-клеток и/или количество эффекторных Т-клеток, например, CD3+, CD4+ или CD8+ Т-эффекторных клеток, и которые дополнительно увеличивают активность и/или количество Tr1-клеток.

[63] В данном изобретении дополнительно представлены клетки, которые экспрессируют, по меньшей мере, одно анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифического или биспецифического антитела в соответствии с любым из вышеизложенного, например, клетки человека, не

относящегося к человеку млекопитающего, дрожжей, бактерий, амфибий, растений, насекомых или рептилий или клетка человека, необязательно иммунная клетка человека, например, Т-клетка, NK-клетка, моноцит, Т-регуляторная клетка или макрофаг.

[64] В данном изобретении дополнительно представлены антиидиотипические антитела, продуцируемые против анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с любым из вышеизложенного, которые необязательно являются человеческими, гуманизированными и/или аффинно-зрелыми.

[65] В данном изобретении дополнительно представлены анти-антиидиотипические антитела, продуцируемым против антиидиотипического антитела, как описано выше, которое необязательно связывает MCT1 и дополнительно необязательно блокирует или антагонизирует одну или несколько активностей MCT1.

[66] В данном изобретении дополнительно представлены слитые белки, которые содержат анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из вышеуказанного или полипептид CDR3 VH SEQ ID NO: 6 или вариант, обладающий, по меньшей мере, 80% идентичностью последовательности по отношению к нему, который прямо или опосредованно связан с другим полипептидом, например, полипептидом антитела или доменом антитела, сывороточным альбумином, человеческим или другим приматным сывороточным альбумином, аднектином, аффителом, DARPin, антикалином, гликолем (ПЭГ), монометокси-ПЭГ (мПЭГ), молекулой XTEN, молекулой или фрагментом rPEG или вариантом любого из вышеизложенного, например, в которых полипептид или домен антитела содержит полипептид Fc или его фрагмент, например, Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека или их фрагмент.

[67] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или слитые полипептиды, химерные антигенные рецепторы (CAR), мультиспецифические антигенсвязывающие полипептиды или полипептиды мультиспецифических или биспецифических антител в соответствии с любым из вышеизложенного, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного, которое активирует одно или несколько из следующих свойств при связывании с MCT1 на поверхности клетки,

например, активированной Т-клетки или В-клетки, дополнительно необязательно клетки человека:

(i) ингибирует транспорт лактата;

(ii) ингибирует транспорт бромпирувата;

(iii) ингибирует транспорт одного или нескольких монокарбоксилатов, пирувата, оксокислот с разветвленной цепью, происходящих из лейцина, валина и изолейцина, кетоновых тел, ацетоацетата, бета-гидроксибутирата, ацетата, молочной кислоты, клеточных питательных веществ, метаболитов, ионов, гормонов, липидов, и кетонов;

(iv) ингибирует пролиферацию CD3/CD28-стимулированных Т-клеток;

(v) ингибирует пролиферацию активированной Т-клетки или В-клетки;

(vi) ингибирует продуцирование одного или нескольких воспалительных цитокинов;

(vii) уменьшает активность и/или количество эффекторных Т-клеток, например $CD3^+$, $CD4^+$ и/или $CD8^+$ эффекторных Т-клеток;

(viii) повышает долю или активность регуляторных Т (Treg) клеток;

(ix) ингибирует аллогенную активацию в реакции смешанных лимфоцитов;

(x) или комбинация любого из вышеизложенного.

[68] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или слитые полипептиды, химерные антигенные рецепторы (CAR), мультиспецифические антигенсвязывающие полипептиды или полипептиды мультиспецифических или биспецифических антител в соответствии с любым из вышеизложенного, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного, например, в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, которое ингибирует продуцирование одного или нескольких воспалительных цитокинов при связывании с MCT1.

[69] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или слитые полипептиды, химерные антигенные рецепторы (CAR), мультиспецифические антигенсвязывающие полипептиды или полипептиды мультиспецифических или биспецифических

антител в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного, при этом, по меньшей мере, один или несколько воспалительных цитокинов выбирают из FGF2, FLT-3L, фракталкина, G-CSF, GM-CSF, GRO, ИФНα2, ИФНγ, ИЛ-3, ИЛ-5, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-12p40, ИЛ-12p70, ИЛ-13, ИЛ-17a, IP-10, MCP-1, MDC, MIP-1a, MIP-1b, sCD40L, ФНОα и ФНОβ.

[70] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или слитые полипептиды, химерные антигенные рецепторы (CAR), мультиспецифические антигенсвязывающие полипептиды или полипептиды мультиспецифических или биспецифических антител в соответствии с любым из вышеизложенного, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного, при этом, по меньшей мере, один или несколько воспалительных цитокинов выбирают из ИФНγ, GM-CSF, ФНОα, ИЛ-10 и ИЛ-6.

[71] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или слитые полипептиды, химерные антигенные рецепторы (CAR), мультиспецифические антигенсвязывающие полипептиды или полипептиды мультиспецифических или биспецифических антител в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного, которое ингибирует MCT1-опосредованный транспорт лактата в активированные Т-клетки со значением Kd, составляющим менее чем 100 нМ, менее чем 50 нМ или менее чем 10 нМ, как определяют с помощью анализа лактата FLIPR.

[72] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или слитые полипептиды, химерные антигенные рецепторы (CAR), мультиспецифические антигенсвязывающие полипептиды или полипептиды мультиспецифических или биспецифических антител в соответствии с любым из вышеизложенного, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного, которое не:

(i) связывается с MCT2, MCT3, MCT4 и/или CD147, как измеряют с помощью проточной цитометрии;

(ii) ингибирует транспорт MCT2, MCT3 и/или MCT4;

(iii) ингибирует продуцирование ИЛ-2;

(iv) ингибирует транспорт лактата в моноцитах;

(v) ингибирует пролиферацию наивных, покоящихся и/или регуляторных Т-клеток;

(vi) ингибирует транспорт лактата в эритроцитах;

(vii) изменяет экспрессию одного или нескольких маркеров Т-клеточной активации, необязательно выбранных из CD25, CD54, CD69, CD95, CD98, CD147, CD154, CD278, CD279 и HLA-DR/DP/DQ.

[73] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или слитые полипептиды, химерные антигенные рецепторы (CAR), мультиспецифические антигенсвязывающие полипептиды или полипептиды мультиспецифических или биспецифических антител в соответствии с любым из вышеизложенного, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного, которое содержит Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, необязательно Fc-область, которая была модифицирована для изменения, по меньшей мере, одного из эффекторной функции, периода полужизни, протеолиза или гликозилирования, при этом необязательно Fc-область содержит одну или несколько мутаций, которые изменяют или устраняют N- и/или O-гликозилирование.

[74] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или слитые полипептиды, химерные антигенные рецепторы (CAR), мультиспецифические антигенсвязывающие полипептиды или полипептиды мультиспецифических или биспецифических антител в соответствии с любым из вышеизложенного, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного, которое связывается с MCT1 человека с аффинностью (KD), составляющей менее чем 100 нМ, менее чем 50 нМ или менее чем 10 нМ.

[75] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или слитые полипептиды, химерные антигенные рецепторы (CAR), мультиспецифические антигенсвязывающие полипептиды или полипептиды мультиспецифических или биспецифических антител в соответствии с любым из вышеизложенного, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного в соответствии с любым из

предыдущих вариантов осуществления, которое дополнительно имеет одну или несколько из следующих модификаций:

(i) конъюгировано с цитотоксическим агентом;

(ii) содержится в биспецифическом антителе;

(iii) содержится в мультиспецифическом антигенсвязывающем белке;

(iv) конъюгировано с меткой; а также

(v) конъюгировано с другим терапевтическим агентом, необязательно иммунодепрессивным агентом или химиотерапевтическим агентом.

[76] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или слитые полипептиды, химерные антигенные рецепторы (CAR), мультиспецифические антигенсвязывающие полипептиды или полипептиды мультиспецифических или биспецифических антител в соответствии с любым из вышеизложенного, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного, при этом метка представляет собой хемилюминесцентную метку, парамагнитную метку, контрастный агент для получения изображения с помощью МРТ, флуоресцентную метку, биолюминесцентную метку или радиоактивную метку, или цитотоксический агент представляет собой фрагмент, который ингибирует синтез ДНК, РНК или белка; радионуклид; или белок, ингибирующий рибосомы.

[77] В данном изобретении дополнительно представлены анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или слитые полипептиды, химерные антигенные рецепторы (CAR), мультиспецифические антигенсвязывающие полипептиды или полипептиды мультиспецифических или биспецифических антител в соответствии с любым из вышеизложенного, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного в соответствии с любым из вышеизложенного, которое является подходящим для лечения субъекта-человека, имеющего аутоиммунное, воспалительное или аллергическое патологическое состояние; нарушение обмена веществ (например, сахарный диабет), поликистозное заболевание почек (ADPKD), рак; являющегося реципиентом трансплантата, или имеющего EIHI или любое другое патологическое состояние, при котором сниженное количество и/или активность Т-эффекторных клеток, например, CD3+ Т-клеток, CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-

клеток и/или повышенная активность и/или количество Tr1 или Т-супрессорных клеток является терапевтически предпочтительной.

[78] В данном изобретении дополнительно представлены антиидиотипические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, продуцируемые против анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в соответствии с любым из вышеизложенного, которое необязательно нейтрализует один или несколько биологических эффектов анти-MCT1 антитела или антиген-связывающего фрагмента, с которым оно связывается.

[79] В данном изобретении дополнительно представлены анти-антиидиотипические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, продуцируемые против антиидиотипического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в соответствии с предыдущим, необязательно при этом анти-антиидиотипическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент нейтрализует антиидиотипическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, с которым оно связывается.

[80] В данном изобретении дополнительно представлены способы применения вышеописанного антиидиотипического антитела для контроля in vivo уровней указанного анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента у субъекта или для нейтрализации эффектов in vivo указанного анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающий фрагмент у субъекта.

[81] В данном изобретении дополнительно представлены полинуклеотиды, кодирующие анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид, или полипептид мультиспецифического или биспецифического антитела, или анти-MCT1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или анти-анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из вышеизложенного, экспрессионные векторы, содержащие то же самое, и клетки-хозяева, содержащие указанные полинуклеотиды или экспрессионные векторы, необязательно иммунную клетку человека, например Т-клетку, В-клетку или NK-клетку.

[82] В данном изобретении дополнительно представлены фармацевтические или диагностические композиции, содержащим эффективное количество анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитого полипептида, химерного антигенного рецептора (CAR), мультиспецифического

антигенсвязывающего полипептида, или полипептида мультиспецифического или биспецифического антитела, или анти-анти-МСТ1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или анти-анти-МСТ1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с любым из вышеизложенного, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного, например, которые являются подходящими для применения в лечении или профилактике человека или не относящегося к человеку организма.

[83] В данном изобретении дополнительно представлены способы получения выделенного анти-МСТ1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающие культивирование клетки-хозяина, как описано выше, в условиях, которые позволяют экспрессию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и извлечение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из культуральной среды или клетки-хозяина.

[84] В данном изобретении дополнительно представлены фармацевтические композиции, содержащие фармацевтически эффективное количество выделенного анти-МСТ1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, антиидиотипического антитела, слитого полипептида, химерного антигенного рецептора (CAR), мультиспецифического антигенсвязывающего полипептида, или полипептида мультиспецифического или биспецифического антитела, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного, например, клетки, содержащие фармацевтический разбавитель, носитель или наполнитель, и, необязательно, которые могут содержать другой терапевтический агент, например, ингибитор митохондрий и/или бигуанид и/или другой транспортер монокарбоксилата (ингибитор МСТ), например, ингибитор SLC16A1, SLC16A2, SLC16A3, SLC16A4, SLC16A5, SLC16A6, SLC16A7, SLC16A8, SLC16A9, SLC16A10, SLC16A11, SLC16A12, SLC16A13 или SLC16A14, или ингибитор МСТ1, МСТ2, МСТ3, МСТ4, МСТ5, МСТ6, МСТ7, МСТ8, МСТ9 или МСТ10, при этом указанный ингибитор может ингибировать один или несколько из перечисленных выше транспортеров, и дополнительно указанный ингибитор необязательно содержит малую молекулу, РНКи, антитело, фрагмент антитела или слитый белок, или при этом указанный другой активный агент выбирают из метформина, фенформина, алексидина, бисбигуанида, буформина, хлоргексидина, хлорпрогуанила, фенилбигуанида, полиаминопропилбигуанида, полигексанида, мороксидина, глипизида, глибурида, репаглинида, саксаглиптина, ситаглиптина, пирвиниума

памоата, прогуанила, доксициклина, атовакуона, канаглифлозина, глитазонов (например, троглитазона, пиоглитазона, розиглитазона), тайгециклина, тиазолидов (например, нитазоксанида), салициланилидов (например, клозантела, оксиклозанида, никлозамида), пергексилина, пропонолола, фенофибрата, миконазола, нефазодона, пентамидина, гидрокортизона, метайодбензилгуанидина, лонидамина, альфа-токоферилсукцината (первичная форма витамина Е), угольной ангидразы, ME344 (MEI Pharma), ингибиторов HIF1a (например, хризина, хетомина, диметил-бисфенола А, BAY84-2243), SR13800, диметилоксалоилглицина (DMOG), карбонилцианида п-трифторметоксифенилгидразона (FCCP), карбонилцианид м-хлорфенилгидразона (CCCP), антимицина А, олигомицина, салиномицина, динитрофенола, ротенона, фенформина, тирфостина 9, атпенина А5, берберина, азида, цианида, закиси азота, триоксида мышьяка, пирвиния, канаглифлозина, росиглитазона, амобарбитала, хонокиола, арктигенина, сложного фенилового эфира кофеиновой кислоты, перфеназина, трифлуоперазина, метилглиоксаля и комбинаций, содержащих любое из вышеизложенного.

[85] В данном изобретении дополнительно представлены способы ингибирования активности и/или количества Т-эффекторных клеток, например, CD3+, CD4+ и/или CD8+ Т-эффекторных клеток, у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитого полипептида, химерного антигенного рецептора (CAR), мультиспецифического антигенсвязывающего полипептида или полипептида мультиспецифического или биспецифического антитела в соответствии с любым из вышеизложенного, или клетка, которая экспрессирует, по меньшей мере, одно из вышеизложенного, или фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически или профилактически эффективное количество любого из вышеизложенного.

[86] В данном изобретении дополнительно представлены способы повышения активности и/или количества Tr1 клеток у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитого полипептида, химерного антигенного рецептора (CAR), мультиспецифического антигенсвязывающего полипептида или полипептида

мультиспецифического или биспецифического антитела в соответствии с любым из вышеизложенного, или клетка, которая экспрессирует, по меньшей мере, одно из вышеизложенного, или фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически или профилактически эффективное количество любого из вышеизложенного.

[87] В данном изобретении дополнительно представлены способы ингибирования активности и/или количества Т-эффекторных клеток, например CD3+, CD4+ и/или CD8+ Т-эффекторных клеток, и повышения активности и/или количества Т-супрессорных или Tr1 клеток у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитого полипептида, химерного антигенного рецептора (CAR), мультиспецифического антигенсвязывающего полипептида, или полипептида мультиспецифического или биспецифического антитела в соответствии с любым из вышеизложенного, или клетка, которая экспрессирует, по меньшей мере, одно из вышеизложенного, или фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически или профилактически эффективное количество любого из вышеизложенного, например, при этом субъект имеет аутоиммунное патологическое состояние, аллергическое патологическое состояние, воспалительное патологическое состояние, нарушение обмена веществ, рак, является реципиентом трансплантата, реципиентом клеточной терапии, имеет состояние EIHI, поликистозное заболевание почек (ADPKD), характеризующийся повышенной активностью Т-эффекторных клеток, например, CD3+, CD4+ или CD8+ и/или сниженной активностью Т-супрессоров или Tr1 клеток и/или сниженным количеством Т-супрессоров или Tr1 клеток.

[88] В данном изобретении представлены способы предупреждения или лечения аутоиммунного патологического состояния, аллергического патологического состояния, воспалительного патологического состояния, нарушения обмена веществ, рака, отторжения трансплантата у реципиента, отторжения при клеточной терапии у реципиента, состояния EIHI, поликистозного заболевания почек (ADPKD), или симптомов, связанных с любым из указанных патологических состояний, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически или профилактически эффективного количества анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитого полипептида,

химерного антигенного рецептора (CAR), мультиспецифического антигенсвязывающего полипептида или полипептида мультиспецифического или биспецифического антитела в соответствии с любым из вышеизложенного, или клетка, которая экспрессирует, по меньшей мере, одно из вышеизложенного, или фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически или профилактически эффективное количество любого из вышеизложенного, например, при этом аутоиммунное патологическое состояние, аллергическое патологическое состояние, воспалительное патологическое состояние, нарушение обмена веществ, рак, отторжение трансплантата у реципиента, отторжение клеточной терапии у реципиента, состояние EIHI, поликистозное заболевание почек (ADPKD), характеризующееся повышенной активностью Т-эффекторных клеток, например, CD3+, CD4+ или CD8+ и/или сниженной активностью Т-супрессоров или Tr1 клеток, и/или уменьшением количества Т-супрессоров или Tr1 клеток, или необязательно при этом нарушение обмена вещества включает в себя болезнь Данона, сахарный диабет, галактоземию Дуарте, MDP-синдром, метаболическую миопатию, недостаточность метилентетрагидрофолатредуктазы, синдром Винчестера, чувствительность к салицилату, Х-сцепленную гипофосфатемию, алкогольный кетоацидоз, врожденную непереносимость алкоголя, альфа-аминоадипическую и альфа-кетоадипическую ацидурию, метаболический ацидоз с высоким анионным интервалом, подагру, синдром возобновления кормления, гипонатриемию, ассоциированную с физической нагрузкой, панкреатит, панкреатит и Metab-L, или, необязательно, при этом патологическое состояние опосредовано, по меньшей мере, частично, активированными Т-клетками или В-клетками и/или клетками, экспрессирующими MCT1.

[89] В данном изобретении дополнительно представлены способы в соответствии с любым из вышеизложенного, при этом введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитого белка имеет один или несколько из следующих эффектов:

(i) ингибирует транспорт лактата в активированных Т-клетках или В-клетках;

(ii) ингибирует транспорт токсина бромпирувата в активированных Т-клетках или В-клетках;

(iii) ингибирует пролиферацию CD3/CD28-стимулированных Т-клеток;

(iv) ингибирует пролиферацию активированных Т-клеток;

(v) ингибирует продуцирование и/или секрецию одного или нескольких воспалительных цитокинов;

(vi) не ингибирует продуцирование и/или секрецию ИЛ-2;

(vii) повышает продуцирование кетонов мочи;

(viii) повышает время выживания;

(ix) уменьшает отторжение трансплантата;

(x) повышает долю или активность регуляторных Т (Treg) клеток;

(xi) повышает долю $CD4^+$ Т-клеток, которые представляют собой Treg;

(xii) уменьшает долю $IgG1^+$ В-клеток;

(xiii) уменьшает долю В-клеток зародышевого центра;

(xiv) не ингибирует транспорт лактата в эритроцитах человека;

(xv) уменьшает активацию Т-клеток; а также

(xvi) уменьшает активность цитотоксических Т-клеток.

[90] В данном изобретении дополнительно предоставлены способы в соответствии с любым из вышеизложенного, которые используют для лечения или предупреждения, по меньшей мере, одного из: системной красной волчанки, отторжения трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (GVHD), сахарного диабета 1 типа или 2 типа или ожирения.

[91] В данном изобретении дополнительно представлены способы в соответствии с любым из вышеизложенного, при этом эффективность лечения контролируют с помощью измерения кетонов мочи, повышения количества TR1 клеток, снижения или повышения экспрессии биомаркера, выбранного из воспалительного цитокина, ИФНγ, GM-CSF, ФНОα, ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-2, TIGIT, PD1, гранзима В, путем уменьшения количества эффекторных Т-клеток и/или hCD3+ клеток, подавления пролиферации МКПК или комбинации любого из вышеизложенного.

[92] В данном изобретении дополнительно представлены способы оценки терапевтической эффективности анти-MCT1 антагонистического антитела, которые включают в себя обнаружение его эффекта in vitro или in vivo в отношении любого из вышеизложенного: кетонов мочи, количества TR1 клеток,

экспрессии биомаркера, выбранного из воспалительного цитокина, ИФНγ, GM-CSF, ФНОα, ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-2, TIGIT, PD1, гранзима B, уменьшения количества эффекторных Т-клеток и/или hCD3+ клеток, подавления пролиферации МКПК или комбинации любого из вышеизложенного.

[93] В данном изобретении дополнительно представлены способы в соответствии с любым из вышеизложенного, лечения или предупреждения повторного развития рака, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически или профилактически эффективного количества анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитого полипептида, химерного антигенного рецептора (CAR), мультиспецифического антигенсвязывающего полипептида или полипептида мультиспецифического или биспецифического антитела в соответствии с любым из вышеизложенного, или клетка, которая экспрессирует, по меньшей мере, одно из вышеизложенного, или фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически или профилактически эффективное количество любого из вышеизложенного, например, при этом опухолевые клетки экспрессируют MCT1 или субъект представляет собой млекопитающее или субъект представляет собой млекопитающее, выбранное из человека, не человекообразного примата или грызуна.

[94] В данном изобретении дополнительно представлены способы ингибирования или снижения активности активированных Т-клеток или В-клеток, включающие приведение в контакт указанных активированных клеток с анти-MCT1 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или слитым полипептидом, химерным антигенным рецептором (CAR), мультиспецифическим антигенсвязывающим полипептидом или полипептидом мультиспецифического или биспецифического антитела, или клетка, которая экспрессирует, по меньшей мере, одно из вышеизложенного в соответствии с любым из вышеизложенного.

[95] В данном изобретении дополнительно представлены способы в соответствии с любым из вышеизложенного, при этом анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифического или биспецифического антитела, или клетку, которая экспрессирует, по меньшей мере, одно из

вышеизложенного в соответствии с любым из вышеизложенного вводят в качестве монотерапии.

[96] В данном изобретении дополнительно представлены способы в соответствии с любым из вышеизложенного, при этом анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид, или полипептид мультиспецифического или биспецифического антитела, или клетку, которая экспрессирует, по меньшей мере, одно из вышеизложенного в соответствии с любым из вышеизложенного, вводят в комбинации с вторым терапевтическим агентом, например, при этом терапевтический агент выбирают из иммунодепрессивного препарата, химиотерапевтического агента, бигуанида, например, метформина или другого антидиабетического агента, или противовоспалительного агента, или указанный другой терапевтический агент представляет собой ингибитор митохондрий и/или бигуанид, или указанный другой терапевтический агент выбирают из метформина, фенформина, алексидина, бисбигуанида, буформина, хлоргексидина, хлорпрогуанила, фенилбигуанида, полиаминопропилбигуанида, полигексанида, мороксидина, глипизида, глибурида, репаглинида, саксаглиптина, ситаглиптина, пирвиниума памоата, прогуанила, доксициклина, атовакуона, канаглифлозина, глитазонов (например, троглитазона, пиоглитазона, розиглитазона), тайгециклина, тиазолидов (например, нитазоксанида), салициланилидов (например, клозантела, оксиклозанида, никлозамида), пергексилина, пропонолола, фенофибрата, миконазола, нефазодона, пентамидина, гидрокортизона, метайодбензилгуанидина, лонидамина, альфа-токоферилсукцината (первичная форма витамина E), угольной ангидразы, ME344 (MEI Pharma), ингибиторов HIF1a (например, хризина, хетомина, диметил-бисфенола A, BAY84-2243), SR13800, диметилоксалоилглицина (DMOG), карбонилцианида п-трифторметоксифенилгидразона (FCCP), карбонилцианид м-хлорфенилгидразона (CCCP), антимицина A, олигомицина, салиномицина, динитрофенола, ротенона, фенформина, тирфостина 9, атпенина A5, берберина, азида, цианида, закиси азота, триоксида мышьяка, пирвиния, канаглифлозина, росиглитазона, амобарбитала, хонокиола, арктигенина, сложного фенилового эфира кофеиновой кислоты, перфеназина, трифлуоперазина, метилглиоксаля и комбинаций, содержащих любое из вышеизложенного.

[97] В данном изобретении дополнительно представлены способы в соответствии с любым из вышеизложенного, при этом анти-MCT1 антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок или фармацевтическую композицию вводят энтерально, парентерально или местно.

[98] В данном изобретении дополнительно представлены способы контроля эффективности лечения антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или слитым белком, который связывается с MCT1 и снижает MCT1-опосредованный транспорт лактата, включающие измерение уровня кетонов мочи.

[99] В данном изобретении дополнительно представлены способы диагностики патологического состояния, выбранного из аутоиммунного, воспалительного или аллергического патологического состояния; рака; EIHI; поликистозного заболевания почек (ADPKD); сахарного диабета или другое нарушения обмена веществ, и/или патологического состояния, ассоциированного с повышением регуляции MCT1, при этом указанный способ включает:

(i) выделение клеток, ответственных за опосредование патологического состояния;

(ii) приведение в контакт указанных клеток с анти-MCT1 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или MCT1-связывающим слитым белком; а также

(iii) определение уровня анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или MCT1-связывающего слитого белка, связанного с указанными клетками.

[100] В данном изобретении дополнительно представлены способы лечения и обнаружения, как описано выше, при этом патологическое состояние представляет собой аутоиммунное, воспалительное нарушение, отторжение трансплантата, GVHD, нарушение обмена веществ (например, сахарный диабет), EIHI; поликистозное заболевание почек (ADPKD); или аллергическое патологическое состояние, например, при этом состояние представляет собой аутоиммунное, воспалительное нарушение, отторжение трансплантата, GVHD, нарушение обмена веществ (например, сахарный диабет), поликистозное заболевание почек (ADPKD) или аллергическое патологическое состояние, и клетки представляют собой активированные Т-клетки или В-клетки, или

патологическое состояние представляет собой рак, а клетки представляют собой опухолевые клетки, или патологическое состояние представляет собой EIHI, а клетки представляют собой бета-клетки.

[101] В данном изобретении дополнительно представлены способы лечения и обнаружения, как описано выше, при этом анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или MCT1-связывающий слитый белок включает в себя одно или несколько из следующего:

(i) конкурирует с анти-MCT1 антителом, выбранным из любого из Ат1-Ат95 или другого анти-MCT1 антитела, содержащего те же самые CDR, что и любое из вышеуказанных анти-MCT1 антител;

(ii) содержит те же самые CDR, что и антител против MCT1 человекао, выбранное из Ат1-Ат95;

(iii) содержит аффинно-зрелый или гуманизированный вариант антител против MCT1 человекаа, выбранного из Ат1-Ат95;

(iv) конкурирует с антителом, содержащим домен V_H, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена V_H Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 2), или с любым из Ат1-Ат95; и содержащим домен V_L, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена V_L Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 3), или с любым из Ат2-Ат95;

(v) содержит последовательности CDR тяжелой цепи Ат1 к MCT1 (SEQ ID NOS: 4, 5, 6) и последовательности CDR легкой цепи Ат1 к MCT1 (SEQ ID NOS: 7, 8, 9) или последовательности любого из Ат2-Ат95;

(vi) конкурирует с антителом, содержащим или представляющим собой домен V_H, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или 100%

идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена V_H Ат1 к МСТ1 (SEQ ID NO: 2), или с любым из Ат2-Ат60; и представляющим собой домен V_L, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена V_L Ат1 к МСТ1 (SEQ ID NO: 3), или с любым из Ат2-Ат60;

(vii) конкурирует с антителом, содержащим или представляющим собой домен V_H, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена V_H, выбранного из антител SEQ ID NO: 2, 12, 14, 16, 19-32, или с любым из Ат5-Ат60; и/или

(viii) конкурирует с антителом, содержащим или представляющим собой домен V_L, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена V_L, выбранного из антител SEQ ID NO: 13, 15, 17, 33-44, или с любым из Ат5-Ат60; и/или

(ix) содержит, по меньшей мере, один пептид, содержащий последовательность, идентичную последовательности SEQ ID NO: 6, или содержащую последовательность, которая отличается от нее не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток, при этом указанный пептид прямо или косвенно связан с другим полипептидом, например, полипептидом антитела или доменом антитела, сывороточным альбумином, сывороточным альбумином человека или других приматов, аднектином, аффителом, DARPin, антикалином, гликолем (ПЭГ), монометокси-ПЭГ (мПЭГ), молекулой XTEN, молекулой или фрагментом rPEG или вариантом любого из вышеизложенного.

[102] Способы обнаружения экспрессии MCT1 по данному изобретению, необязательно функционального MCT1, клеткой, включают определение того, связывается ли какое-либо из анти-MCT1 антител в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, которые связываются с MCT1, экспрессируемым указанной клеткой, например, при этом клетка принадлежит человеку или не относящемуся к человеку организму, например, при этом клетку получают от пациента, имеющего или предположительно имеющего аутоиммунное патологическое состояние, аллергическое патологическое состояние, воспалительное патологическое состояние, нарушения обмена веществ, рак, представляющего собой реципиента трансплантата, реципиента клеточной терапии, имеющего состояние EIHI, поликистозное заболевание почек (ADPKD), или при этом способ обнаружения используется для диагностики или контроля заболевания или прогноза заболевания с использованием образца клеток, полученного от пациента, имеющего или предположительно имеющего аутоиммунное патологическое состояние, аллергическое патологическое состояние, воспалительное патологическое состояние, нарушение обмена веществ, рак, представляющего собой реципиента трансплантата, реципиента клеточной терапии, имеющего состояние EIHI, поликистозное заболевание почек (ADPKD), характеризующееся клетками, которые включают в себя аберрантную (повышенную) экспрессию или активность MCT1.

[103] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбирают из группы, состоящей из: моноклонального антитела; моноспецифического антитела; полиспецифического антитела; гуманизированного антитела; тетрамерного антитела; четырехвалентного антитела; мультиспецифического антитела; одноцепочечного антитела; домен-специфического антитела; однодоменного антитела; антитела с делецией домена; слитого белка scFc; химерного антитела; синтетического антитела; рекомбинантного антитела; гибридного антитела; мутированного антитела; CDR-привитых антител; фрагмента антитела; Fab; F(ab′)2; Fab′-фрагмента; Fv-фрагмента; одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv); Fd-фрагмента; фрагмента dAb; множественных специфических антител, диател; ByTE, бивалентных антител, нанотела; бивалентного нанотела; вариабельного домена IgNAR акулы; антитела к VHH; антитело верблюдовых; и минитела.

[104] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой человеческое, гуманизированное или химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[105] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-MCT1 антитело, которое конкурирует или которое связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и любое из антител, которые определены в данном документе как Ат1-Ат95, при этом такое антитело или антигенсвязывающий фрагмент необязательно антагонизирует одну или несколько ассоциированных с MCT1 функций, например, ингибирует MCT1-опосредованный транспорт лактата.

[106] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-MCT1 антитело, которое содержит, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 CDR в качестве любого из анти-MCT1 антител, которые определены в данном документе как Ат1-Ат95, при этом такое антитело или антигенсвязывающий фрагмент необязательно антагонизирует одну или несколько функций, ассоциированных с MCT1, например, ингибирует MCT1-опосредованный транспорт лактата.

[107] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-MCT1 антитело или антиген-связывающий фрагмент, который содержит гуманизированное, химерное, scFv или аффинно-зрелое производное любого из анти-MCT1 антител, которые определены в данном документе как Ат1-Ат95, при этом такое антитело или антигенсвязывающий фрагмент необязательно антагонизирует одну или несколько функций, ассоциированных с MCT1, например, ингибирует MCT1-опосредованный транспорт лактата.

[108] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой слитый полипептид или мультиспецифический полипептид, который содержит, по меньшей мере, один анти-MCT1 антигенсвязывающий домен, который содержит те же самые CDR или вариабельные области тяжелой и/или легкой цепи, что и любое из анти-MCT1 антител, которые определены в данном документе как Ат1-Ат95, при этом такой слитый полипептид или мультиспецифический полипептид необязательно

антагонизирует одну или несколько функций, ассоциированных с MCT1, например, ингибирует MCT1-опосредованный транспорт лактата.

[109] В некоторых вариантах осуществления анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент будет содержать последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую 19, 20, 21, 22, 23 или 24 аминокислотных остатка. В некоторых вариантах осуществления последовательность CDR3 тяжелой цепи содержит 21, 22 или 23 аминокислотных остатка. В некоторых вариантах осуществления последовательность CDR3 тяжелой цепи является идентичной последовательности SEQ ID NO: 6 или отличается от нее не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток. В некоторых вариантах осуществления указанные замены, если они присутствуют, включают в себя консервативные аминокислотные замены или содержат замещающие аминокислоты, которые преобладают в том же же самом положении в CDR3 тяжелой цепи антител человека или грызуна.

[110] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с MCT1 с референтным антителом, при этом референтное антитело содержит:

i. последовательности CDR тяжелой цепи Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 4, 5, 6) и последовательности CDR легкой цепи Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 7, 8, 9); или

ii. домен V_H, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена VH Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 2); и содержащие домен V_L, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена VL Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 3).

[111] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDR тяжелой цепи Ат1 к MCT1 (SEQ ID NOS: 4, 5, 6) и последовательности CDR легкой цепи Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 7, 8, 9).

[112] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен VH, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена VH Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 2); и содержит домен VL, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена VL Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 3).

[113] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен VH, содержащий те же самые CDR, которые содержатся в домене VH любого из анти-MCT1 антител, определенных в данном документе как Ат1-Ат95, и/или содержит домен VL, содержащий те же самые CDR в качестве домена VH любого из анти-MCT1 антител, определенных в данном документе как Ат1-Ат83.

[114] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен VH, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена VH любого из анти-MCT1 антител, определенных в данном документе как Ат1-Ат95, и/или и содержит домен VL, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена VH любого из анти-MCT1 антител, определенных в данном документе как Ат1-Ат83.

[115] В некоторых вариантах осуществления анти-MCT1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент будут связываться с одним или несколькими из следующих остатков эпитопа, связанного анти-MCT1 антителами в соответствии с данным изобретением, т.е., любым из Ат1-Ат95, необязательно при этом остатки, которые составляют эпитоп, определяются с помощью сканирования аланином.

[116] В некоторых вариантах осуществления CDR анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента будут иметь трехмерную структуру, аналогичную структуре Ат1 к MCT1, на что указывают положения альфа-атомов

углерода в соответствующих CDR, отличающиеся средним среднеквадратичным отклонением (RMSD) менее чем 2,0 Å, менее чем 1,0 Å или менее чем 0,5 Å, как определяют с помощью структурного выравнивания, как показано на **Фиг. 21**.

[117] В данном изобретении дополнительно представлено анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий полипептид вариабельного домена тяжелой цепи или полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 12, 14, 16, 19-32, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153 и 155, и полипептид вариабельного домена легкой цепи или полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 3, 13, 15, 17, 33-44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 150, 152, 144, 146, 148, 150, 152, 154 и 156.

[118] В данном изобретении, в частности, представлено анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий полипептид вариабельного домена тяжелой цепи и полипептид вариабельного домена легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, соответственно выбранную из следующего: SEQ ID NO: 2 и 3; SEQ ID NO: 12 и 13; SEQ ID NO: 14 и 15; SEQ ID NO: 16 и 17; SEQ ID NO: 45 и 46; SEQ ID NO: 47 и 48; SEQ ID NO: 49 и 50; SEQ ID NO: 51 и 52; SEQ ID NO: 53 и 54; SEQ ID NO: 55 и 56; SEQ ID NO: 57 и 58; SEQ ID NO: 59 и 60; SEQ ID NO: 61 и 62; SEQ ID NO: 63 и 64; SEQ ID NO: 65 и 66; SEQ ID NO: 67 и 68; SEQ ID NO: 69 и 70; SEQ ID NO: 71 и 72; SEQ ID NO: 73 и 74; SEQ ID NO: 75 и 76; SEQ ID NO: 77 и 78; SEQ ID NO: 79 и 80; SEQ ID NO: 81 и 82; SEQ ID NO: 83 и 84; SEQ ID NO: 85 и 86; SEQ ID NO: 87 и 88; SEQ ID NO: 89 и 90; SEQ ID NO: 91 и 92; SEQ ID NO: 93 и 94; SEQ ID NO: 95 и 96; SEQ ID NO: 97 и 98; SEQ ID NO: 99 и 100; SEQ ID NO: 101 и 102; SEQ ID NO: 103 и 104; SEQ ID NO: 105 и 106; SEQ ID NO: 107 и 108; SEQ ID NO: 109 и 110; SEQ ID NO: 111 и 112; SEQ ID NO: 113 и 114; SEQ ID NO: 115 и 116; SEQ ID NO: 117 и 118; SEQ ID NO: 119 и 120; SEQ ID NO: 121 и 122; SEQ ID NO: 123 и 124; SEQ ID NO: 125 и 126; SEQ ID NO: 127 и 128; SEQ ID NO: 129 и 130; SEQ ID NO: 131 и 132; SEQ ID NO: 133 и 134; SEQ ID NO: 135 и 136; SEQ ID NO: 137 и 138; SEQ ID NO: 139 и 140; SEQ ID NO: 141 и 142;

SEQ ID NO: 143 и 144; SEQ ID NO: 145 и 146; SEQ ID NO: 147 и 148; SEQ ID NO: 149 и 150; SEQ ID NO: 151 и 152; SEQ ID NO: 153 и 154 и SEQ ID NO: 155 и 156.

[119] В данном изобретении дополнительно представлено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий домен VH, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена VH Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 2); и содержащие домен VL, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена VL Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 3).

[120] В данном изобретении представлен слитый белок, который содержит, по меньшей мере, один пептид, содержащий последовательность, идентичную последовательности SEQ ID NO: 6, или содержащую последовательность, которая отличается от нее не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток, при этом указанный пептид прямо или косвенно связан с другим полипептидом, например, полипептидом антитела или доменом антитела, сывороточным альбумином, сывороточным альбумином человека или других приматов, аднектином, аффителом, DARPin, антикалином, гликолем (ПЭГ), монометокси-ПЭГ (мПЭГ), молекулой XTEN, молекулой или фрагментом rPEG или вариантом любого из вышеизложенного. В некоторых вариантах осуществления полипептид или домен антитела содержит полипептид Fc или его фрагмент, например, Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления указанные замены, если они присутствуют, включают в себя консервативные аминокислотные замены или содержат замещающие аминокислоты, которые преобладают в том же же самом положении в CDR3 тяжелой цепи антител человека или грызуна.

[121] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок имеет одно или несколько из следующих свойств при связывании с MCT1 на поверхности активированной Т-клетки или В-клетки:

i. ингибирует транспорт лактата;

ii. ингибирует транспорт бромпирувата;

iii. ингибирует транспорт одного или нескольких монокарбоксилатов, пирувата, оксокислот с разветвленной цепью, происходящих из лейцина, валина и изолейцина, кетоновых тел, ацетоацетата, бета-гидроксибутирата, ацетата, молочной кислоты, клеточных питательных веществ, метаболитов, ионов, гормонов, липидов, и кетонов;

iv. ингибирует пролиферацию CD3/CD28-стимулированных Т-клеток;

v. ингибирует пролиферацию активированной Т-клетки или В-клетки;

vi. ингибирует продуцирование одного или нескольких воспалительных цитокинов;

vii. повышает долю или активность регуляторных Т (Treg) клеток; а также

viii. ингибирует аллогенную активацию в реакции смешанных лимфоцитов.

[122] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок ингибирует продуцирование одного или нескольких воспалительных цитокинов при связывании с MCT1. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один из одного или нескольких цитокинов, относится, например, к воспалительным цитокинам, при этом такие цитокины могут включать в себя любое из следующего: FGF2, FLT-3L, фрактилкин, G-CSF, GM-CSF, GRO, ИФНα2, ИФНγ, ИЛ-3, ИЛ-5, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-12p40, ИЛ-12p70, ИЛ-13, ИЛ-17a, IP-10, MCP-1, MDC, MIP-1a, MIP-1b, sCD40L, ФНОα и ФНОβ. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один из одного или нескольких воспалительных цитокинов выбирают из ИФНγ, GM-CSF, ФНОα, ИЛ-10 и ИЛ-6.

[123] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок ингибирует MCT1-опосредованный транспорт лактата в активированных Т-клетках со значением Kd, составляющим менее чем 100 нМ, менее чем 50 нМ или менее чем 10 нМ, как определяют с помощью анализа лактата FLIPR.

[124] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок не:

i. связывается с MCT2, MCT3, MCT4 и/или CD147, как измеряют с помощью проточной цитометрии;

ii. ингибирует транспорт MCT2, MCT3 и/или MCT4;

iii. ингибирует продуцирование ИЛ-2;

iv. ингибирует транспорт лактата в моноцитах;

v. ингибирует пролиферацию наивных, покоящихся и/или регуляторных Т-клеток;

vi. ингибирует транспорт лактата в эритроцитах;

vii. изменяет экспрессию одного или нескольких маркеров Т-клеточной активации, необязательно выбранных из CD25, CD54, CD69, CD95, CD98, CD147, CD154, CD278, CD279 и HLA-DR/DP/DQ.

[125] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок содержит Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

[126] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок содержит Fc-область, которая была модифицирована для изменения, по меньшей мере, одной из эффекторных функций, периода полужизни, протеолиза или гликозилирования, при этом необязательно Fc-область содержит одну или несколько мутаций, которые изменяют или устраняют N- и/или O-гликозилирование.

[127] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок связывает MCT1 со значением аффинности (K_D), составляющим менее чем 100 нМ, менее чем 50 нМ или менее чем 10 нМ.

[128] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок дополнительно имеет одну или несколько из следующих модификаций:

i. конъюгирован с цитотоксическим агентом;

ii. содержится в биспецифическом антителе;

iii. содержится в мультиспецифическом антигенсвязывающем белке;

iv. конъюгирован с меткой; а также

v. конъюгирован с другим терапевтическим агентом, необязательно иммунодепрессивным агентом или химиотерапевтическим агентом.

[129] В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой хемилюминесцентную метку, парамагнитную метку, контрастный агент для получения изображения с помощью МРТ, флуоресцентную метку, биолюминесцентную метку или радиоактивную метку.

[130] В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой фрагмент, который ингибирует синтез ДНК, РНК или белка; радионуклид; или белок, ингибирующий рибосомы.

[131] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок является подходящим для лечения субъекта-человека, имеющго аутоиммунное, воспалительное или аллергическое патологическое состояние; рак; или EIHI.

[132] В данном изобретении также представлено антиидиотипическое антитело или их антигенсвязывающий фрагмент, продуцируемые против анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, которое необязательно нейтрализует один или несколько биологических эффектов анти-MCT1 антитела или антиген-связывающего фрагмента, с которым оно связывается. В данном изобретении дополнительно представлено анти-антиидиотипическое антитело или их антигенсвязывающий фрагмент, продуцируемый против антиидиотипического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, необязательно при этом антиидиотипическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент нейтрализует антиидиотипическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, с которым оно связывается.

[133] В данном изобретении дополнительно описан способ применения антиидиотипического антитела для контроля *in vivo* уровней указанного анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента у субъекта или для нейтрализации эффектов *in vivo* указанного анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающий фрагмент у субъекта.

[134] В данном изобретении также представлен выделенный полинуклеотид, кодирующий анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления. Дополнительно предоставлены экспрессионные векторы, содержащие такие полинуклеотиды. В данном изобретении также представлена клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор. Данное изобретение дополнительно

относится к способу получения выделенного анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающие культивирование клетки-хозяина в условиях, которые позволяют экспрессию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и извлечение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из культуральной среды или клетки-хозяина.

[135] В данном изобретении дополнительно представлена фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически эффективное количество выделенного анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитого белка, или выделенная клетка, которая экспрессирует то же самое в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, которые могут дополнительно содержать фармацевтический разбавитель, носитель или наполнитель.

[136] В данном документе также представлен способ лечения или профилактики аутоиммунного, аллергического или воспалительного патологического состояния, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически или профилактически эффективного количества анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитого белка в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, или фармацевтической композиции, как описано выше.

[137] В некоторых вариантах осуществления патологическое состояние опосредуется, по меньшей мере, частично, активированными Т-клетками или В-клетками.

[138] В некоторых вариантах осуществления введение анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитого белка имеет один или несколько из следующих эффектов:

i. ингибирует транспорт лактата в активированных Т-клетках или В-клетках;

ii. ингибирует транспорт токсина бромпирувата в активированных Т-клетках или В-клетках;

iii. ингибирует пролиферацию CD3/CD28-стимулированных Т-клеток;

iv. ингибирует пролиферацию активированных Т-клеток;

v. ингибирует продуцирование и/или секрецию одного или нескольких воспалительных цитокинов;

vi. не ингибирует продуцирование и/или секрецию ИЛ-2;

vii. повышает продуцирование кетонов мочи;

viii. повышает время выживания;

ix. уменьшает отторжение трансплантата;

x. повышает долю или активность регуляторных Т (Treg) клеток;

xi. повышает долю $CD4^+$ Т-клеток, которые представляют собой Treg;

xii. уменьшает долю $IgG1^+$ В-клеток;

xiii. уменьшает долю В-клеток зародышевого центра;

xiv. не ингибирует транспорт лактата в эритроцитах человека;

xv. уменьшает активацию Т-клеток; а также

xvi. уменьшает активность цитотоксических Т-клеток.

[139] В некоторых вариантах осуществления способ используется для лечения или профилактики системной красной волчанки.

[140] В некоторых вариантах осуществления способ используется для лечения или предупреждения отторжения трансплантата.

[141] В некоторых вариантах осуществления способ используется для лечения или предупреждения болезни «трансплантат против хозяина» (GVHD).

[142] В некоторых вариантах осуществления способ используется для лечения или профилактики сахарного диабета.

[143] В некоторых вариантах осуществления способ используется для лечения или профилактики ожирения.

[144] В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения контролируют с помощью измерения кетонов мочи.

[145] В данном изобретении дополнительно представлен способ лечения или предупреждения повторного развития рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически или профилактически эффективного количества анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитого белка в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления,

или фармацевтической композиции в соответствии с предыдущими вариантами осуществления.

[146] В некоторых вариантах осуществления опухолевые клетки экспрессируют МСТ1.

[147] В некоторых вариантах осуществления субъектом является млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой не человекообразного примата. В некоторых вариантах млекопитающее представляет собой грызуна.

[148] В данном изобретении также представлен способы ингибирования или снижения активности активированных Т-клеток или В-клеток, включающие приведение в контакт указанных активированных клеток с анти-МСТ1 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или слитым белком в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления.

[149] В некоторых вариантах осуществления анти-МСТ1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок вводят в качестве монотерапии.

[150] В некоторых вариантах осуществления анти-МСТ1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок вводят в комбинации с вторым терапевтическим агентом.

[151] В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент выбирают из иммунодепрессивного лекарственного средства или химиотерапевтического агента.

[152] В некоторых вариантах осуществления анти-МСТ1 антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок или фармацевтическую композицию вводят энтерально, парентерально или местно.

[153] В данном изобретении дополнительно представлен способ контроля эффективности лечения антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или слитым белком, который связывается с МСТ1 и снижает МСТ1-опосредованный транспорт лактата, включающие измерение уровня кетонов мочи.

[154] В дополнительном аспекте в данном изобретении представлен способ диагностики патологического состояния, выбранного из аутоиммунного,

воспалительного или аллергического патологического состояния; рака; EIHI; и патологического состояния, ассоциированного с активацией MCT1, при этом указанный способ включает:

i. выделение клеток, ответственных за опосредование патологического состояния;

ii. приведение в контакт указанных клеток с анти-MCT1 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или MCT1-связывающим слитым белком; а также

iii. определение уровня анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или MCT1-связывающего слитого белка, связанного с указанными клетками.

[155] В некоторых вариантах патологическое состояние представляет собой аутоиммунное, воспалительное или аллергическое патологическое состояние, а клетки представляют собой активированные Т-клетки или В-клетки.

[156] В некоторых вариантах патологическое состояние представляет собой рак, а клетки представляют собой опухолевые клетки.

[157] В некоторых вариантах патологическое состояние представляет собой EIHI, а клетки представляют собой бета-клетки.

[158] В некоторых вариантах осуществления анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или MCT1-связывающий слитый белок:

i. конкурирует с антителом, содержащим последовательности CDR тяжелой цепи Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 4, 5, 6) и последовательности CDR легкой цепи Ат1 к MCT1 (SEQ ID NOS: 7, 8, 9) или анти-MCT1 антитело выбирают из любого из Ат1-Ат95;

ii. конкурирует с антителом, содержащим домен V_H, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена V_H Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 2) или по отношению к домену V_H из любого из Ат1-Ат95; и дополнительно содержащим домен V_L, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по

меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена V_L Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 3) или домена V_L из любого из Ат1-Ат95;

iii. содержит последовательности CDR тяжелой цепи Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 4, 5, 6) и последовательности CDR легкой цепи Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 7, 8, 9);

iv. содержит домен V_H, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена V_H Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 2); и содержит домен V_L, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена V_L Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 3); или

v. содержит, по меньшей мере, один пептид, содержащий последовательность, идентичную последовательности SEQ ID NO: 6, или содержащую последовательность, которая отличается от нее не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток, при этом указанный пептид прямо или косвенно связан с другим полипептидом, например, полипептидом антитела или доменом антитела, сывороточным альбумином, сывороточным альбумином человека или других приматов, аднектином, аффителом, DARPin, антикалином, гликолем (ПЭГ), монометокси-ПЭГ (мПЭГ), молекулой XTEN, молекулой или фрагментом rPEG или вариантом любого из вышеизложенного.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НЕСКОЛЬКИХ ВИДОВ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[159] **На Фиг. 1** изображено, что метаболические состояния лейкоцитов ассоциированы с различными иммунологическими свойствами (**ссылка 33**). Покоящиеся клетки, клетки памяти и Treg клетки зависят от окислительного фосфорилирования (Oxphos) (слева), в то время как пролиферация и эффекторная функция Т-эффекторных клеток в значительной степени зависят от гликолиза после активации антигена (справа).

[160] **На Фиг. 2** изображено, что активация CD3/CD28 индуцирует более высокую экспрессию MCT1 и MCT4 и что значения IC_{50} для ингибирования пролиферации с помощью AZ3965 не изменяются в присутствии высоких (донор 1) или низких (донор 2) уровней экспрессии MCT4 (S = со стимуляцией в течение 3 дней; NS = без стимуляции; BSG = басигин/CD147). Слева направо для донора 1 столбцы соответствуют нестимулированной экспрессии MCT2, MCT4 и BSG, за которой следует стимулированная экспрессия MCT1, MCT2, MCT4 и BSG. Примечание: у донора 1 отсутствовала экспрессия MCT1 в нестимулированных клетках. Слева направо для донора 2 столбцы соответствуют нестимулированной экспрессии MCT1, MCT2, MCT4 и BSG с последующей стимулированной экспрессией MCT1, MCT2, MCT4 и BSG.

[161] На **Фиг. 3** изображены результаты анализа лактата FLIPR с использованием AZ3965. AZ3965 ингибирует транспорт лактата в $CD4^+$ Т-клетках человека (CD4), $CD8^+$ Т-клетках (CD8), клетках В-клеточной лимфомы (Daudi) и мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК), но не в моноцитах (Mono). Сверху вниз при 100 нМ AZ3965 кривые соответствуют Daudi, CD4, CD8, МКПК и Mono.

[162] На **Фиг. 4** изображены результаты анализа пролиферации Т-клеток человека с ингибитором MCT1 на основе малой молекулы. Ингибирование MCT1 приводит к ингибированию пролиферации Т-клеток со значением IC_{50}, составляющим 0,54 нМ.

[163] На **Фиг. 5** изображены результаты анализа реакции смешанных лимфоцитов (MLR) человека с ингибитором MCT1 на основе малой молекулы. Пролиферация Т-клеток в указанном анализе MLR ингибировалась при значении IC_{50}, составлющем 1,34 нМ.

[164] На **Фиг. 6** изображено ингибирование секреции Т-клеточных цитокинов *in vitro* после введения AZ3965. Т-клетки активировали с помощью CD3/CD28 в течение 5 дней до введения лекарственного препарата. Области фигуры красного цвета (более высокая экспрессия) выделяли пунктирной линией черного цвета. Все остальные области имеют синий цвет (более низкая экспрессия). Интенсивность затенения также обозначает экспрессию. AZ3965 ингибирует секрецию ИФНNγ, GM-CSF, ФНОα, ИЛ-10 и ИЛ-6, но не ИЛ-2.

[165] На **Фиг. 7A-J** изображена экспрессия различных маркеров поверхности Т-клеток на активированных Т-клетках после 4 дней обработки 100 нМ ингибитора MCT1 на основе малой молекулы или без обработки по сравнению с

неокрашенным контролем. На каждой панели неокрашивающий контроль антитела представляет собой самый левый пик. На каждой панели отсутствует значимая разница в окрашивании между обработанными и необработанными состояниями. Необработанное состояние представляет собой чуть более высокую кривую для всех панелей, кроме **Фиг. 7H**, где кривая обработанного состояния находится немного выше. Результаты, показанные в данном документе, относятся к следующим маркерам клеточной поверхности: CD25 (**Фиг. 7A**); CD54 (**Фиг. 7B**); CD69 (**Фиг. 7C**); CD95 (**Фиг. 7D**); CD98 (**Фиг. 7E**); CD147 (**Фиг. 7F**); CD154 (**Фиг. 7G**); CD278 (**Фиг. 7H**); CD279 (**Фиг. 7I**); и HLA-DR, DP, DQ (**Фиг. 7J**).

[166] На **Фиг. 8** изображены результаты анализа ксено-GVHD с использованием AZ3965. AZ3965 блокирует заболеваемость GVHD до отмены препарата и превосходит ингибитор JAK.

[167] На **Фиг. 9** изображено дозозависимое повышение частоты тканевых Treg для эксперимента с ксено-GVHD (**Фиг. 8**) во время периода дозирования AZ3965.

[168] На **Фиг. 10** изображены эффекты ингибитора MCT1 на основе малой молекулы в отношении отторжения трансплантата. Как визуально, так и при анализе трансплантата на 10-е сутки введение 25 мг/кг соединения 2x/сутки уменьшало отторжение трансплантата.

[169] На **Фиг. 11A-B** изображено, что введение AZ3965 снижает доли IgG1 B-клеток и B-клеток зародышевого центра у мышей, подвергшихся воздействию эритроцитов овец. На **Фиг. 11A** изображено уменьшение IgG1 B-клеток при введении 2,5 мг/кг AZ3965, а на **Фиг. 11B** показано уменьшение B-клеток зародышевого центра при той же самой дозе.

[170] На **Фиг. 12A-D** изображена перекрестная реактивность Ат1 к MCT1, как оценивается посредством измерений связывания с MCT1 с помощью проточной цитометрии на поверхности МКПК различных видов. На **Фиг. 12A** изображено, что Ат1 к MCT1 связывается с MCT1 на поверхности МКПК человека и что оно в еще большей степени связывается со стимулированными клетками. На **Фиг. 12B** изображено, что Ат1 к MCT1 связывается с MCT1 яванского макака. На **Фиг. 12C** изображено, что Ат1 к MCT1 связывается с MCT1 кролика. На **Фиг. 12D** изображено, что Ат1 к MCT1 не связывается с MCT1 крысы.

[171] На **Фиг. 13A-B** изображено, что Ат1 к MCT1 связывается с активированными T-клетками. Ат1 к MCT1 не окрашивает наивные клетки (**Фиг.**

13A), но окрашивает поверхность активированных CD3/CD28 клеток на 3-е сутки (**Фиг. 13B**). Единственное окрашивание на **Фиг. 13A** соответствует окрашиванию ядра, подтверждая присутствие наивных Т-клеток.

[172] На **Фиг. 14** изображено, что Ат1 к MCT1 ингибирует транспорт лактата MCT1 в активированных Т-клетках *in vitro*. Кривые контроля Ig крысы и контроля-буфера не показывают изменений по сравнению с контролем, в то время как Ат1 к MCT1 приводило к снижению транспорта лактата по сравнению с контролем со значением Kd, составляющим 7,6 нМ (нижняя кривая с правой стороны).

[173] На **Фиг. 15** изображено, что Ат1 к MCT1 ингибирует транспорт токсина бромпирувата, как измеряются с помощью защиты Ат1 к MCT1 от клеточной смерти с использованием ATPlite (Kd = 1,2 нМ).

[174] На **Фиг. 16** изображены результаты анализа пролиферации Т-клеток, в котором Ат1 к MCT1 ингибировало пролиферацию Т-клеток со значением EC_{50}, составляющим 1,3 нМ.

[175] На **Фиг. 17** изображено, что Ат1 к MCT1 ингибировало аллогенную активацию дозозависимым образом в реакции со смешанными лимфоцитами человека.

[176] На **Фиг. 18A-B** изображена экспрессия MCT1 на поверхности эритроцитов от пяти различных видов. На **Фиг. 18A** окрашивание Ат1 к MCT1 очищенных эритроцитов яванского макака (справа) демонстрирует экспрессию MCT1 на плазматической мембране в отличие от очищенных эритроцитов человека (20 доноров, слева), у которых отсутствует экспрессия. На левой панели все из состояния только вторичного Ат, контрольного состояния и состояния окрашенного Ат1 к MCT1 не демонстрируют окрашивания MCT1. На **Фиг. 18B** окрашивание демонстрирует экспрессию MCT1 на поверхности эритроцитов кролика (слева), но не на поверхности эритроцитов крысы (в центре) или бигля (справа).

[177] На **Фиг. 19** изображено, что эритроциты человека не требуют MCT1 для транспорта лактата. Ни ингибирование Ат1 к MCT1, ни ингибирование AZ3965 MCT1 не блокировали транспорт лактата в очищенных эритроцитах человека с использованием анализов транспорта на основе FLIPR (**ссылка 1, 2**). Нет = отсутствие ингибитора.

[178] На **Фиг. 20** изображены результаты анализа проточной цитометрии В-клеток при системной красной волчанке. Иллюстративное окрашивание MCT1 популяций В-клеток от одного здорового пациента и двух пациентов с системной красной волчанкой указывает на значительно повышенное окрашивание MCT1 у пациентов с системной красной волчанкой.

[179] На **Фиг. 21** изображена графическая визуализация кристаллической структуры Fab Ат1 к MCT1, депонированного в указанного заявке как 43260_4200-MCT1_Ab1.pdb. На изображении видно, что CDR3 V_H может наблюдаться за пределы остальной антигенсвязывающей поверхности.

[180] На **Фиг. 22** схематически изображено, что несмотря на то, что MCT1 участвует в различных функциях, существуют избыточные пути, которые устраняют токсичность вне лимфатической системы, однако MCT1 имеет единственный транспортный путь в лимфоидной системе (например, В-, Т-клетках).

[181] На **Фиг. 23** изображено, что эритроциты яванского макака (эритроциты) экспрессируют высокие уровни MCT1.

[182] На **Фиг. 24** изображены эксперименты, указывающие на то, что яванские макаки переносят многократное дозирование анти-MCT1 антитела (Ат1) при 50 мг/кг.

[183] На **Фиг. 25** изображены ФК, наблюдаемые у яванских макаков, которые предполагают, что имеет место эффективное связывание вводимого анти-MCT1 антитела (Ат1), и результаты дополнительно указывают на то, что при уровнях дозы Ат1 $\geq$ 5 мг/кг поглощение эритроцитов является насыщенным.

[184] На **Фиг. 26** изображены эксперименты по оценке тканей-мишеней (мышц, семенника и глаза) у мышей с индуцируемым тамоксифеном нокаутом по MCT1.

[185] На **Фиг. 27** изображено, что у мышей с нокаутом по MCT1 семенники были меньшего размера, а результат микроскопического исследования указал на некоторую дегенерацию сперматид.

[186] На **Фиг. 28** изображено, что фенотип MCT1 KO обеспечивает устойчивый индуцируемый тамоксифеном нокдаун экспрессии MCT1 в различных тканях-мишенях, которые были проанализированы, т.е., тимусе, селезенке, лимфатических узлах, семенниках и сетчатке, по отношению к экспрессии контрольного гена «домашнего хозяйства» (HPRT).

[187] На **Фиг. 29** изображены фенотипические изменения в семенниках, наблюдаемые у нокаутированных мышей. Как показано, дегенерация сперматид наблюдалась в семенниках всех нокаутированных по MCT1 мышей (отсутствие сперматид и сперматоцитов поздних стадий, сниженная целлюлярность канальцев, вакуолизация и клеточные остатки).

[188] На **Фиг. 30** дополнительно сравнивается гистология семенников у мышей ДТ и MCT1 KO и показана повышенная дегенерация сперматид у мышей с нокаутом по сравнению с диким типом.

[189] На **Фиг. 31** обобщены результаты связывания и функциональные результаты при сравнении различных коммерчески доступных анти-MCT1 антител. На фигуре изображена СИФ (вверху, проточная цитометрия, клеточное связывание живых клеток) и результаты функционального анализа с использованием бромпирувата (внизу, RLU) с использованием всех анти-MCT1 антител (мАт и поликлональных Ат), продаваемых Abcam. (Номера по каталогу приведены на фигуре).

[190] На **Фиг. 32** изображены результаты экспериментов, в которых определяли антагонистическую активность различных анти-MCT1 антител, раскрываемых в данном документе, т.е., INX420, INX444, INX356, INX352 и INX453, на основании их относительной способности блокировать активность транспортера MCT1 в анализе с использованием бромпирувата.

[191] На **Фиг. 33** изображено выравнивание областей вариабельного домена тяжелой цепи различных анти-MCT1 антител, раскрываемых в данном документе, т.е., INX420, INX444, INX356, INX352 и INX453.

[192] На **Фиг 34** изображено выравнивание областей вариабельного домена тяжелой цепи различных анти-MCT1 антител, раскрываемых в данном документе, т.е., INX420, INX444, INX356, INX352 и INX453.

[193] На **Фиг. 35A** и **B** соответственно изображено связывание анти-MCT1, раскрываемого в данном документе, с $MCT1^+$ 293 клетками и их относительная функциональность в анализах транспорта токсина бромпирувата.

[194] На **Фиг. 36A-D** изображены экспериментальные данные, на которых сравнивают два анти-MCT1 антитела, раскрываемых в данном документе, т.е., INX310 и INX420, в отношении их относительной способности ингибировать пролиферацию $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток.

[195] На **Фиг. 37A-D** изображены экспериментальные данные, которые демонстрируют, что анти-MCT1 антитело, раскрываемое в данном документе, т.е., INX420, повышает частоту $PD1^+$ $TIGIT^+$ клеток *in vitro* по сравнению с соединением-ингибитором MCT1 на основе малой молекулы.

[196] На **Фиг. 38A-B** изображены экспериментальные данные, которые демонстрируют, что $PD1^+$ $TIGIT^+$ Tr1 клетки подавляют пролиферацию МКПК.

[197] На **Фиг. 39** изображены экспериментальные данные, которые демонстрируют, что блокирование передачи сигнала с участием ИЛ-10 с помощью антагониста ИЛ-10 (анти-ИЛ-10RB) не влияет на подавление пролиферации МКПК с помощью анти-MCT1 антитела, раскрываемого в данном документе, т.е., INX420.

[198] На **Фиг. 40** изображены экспериментальные данные, которые демонстрируют, что лечение животных с ксено-GvHD анти-MCT1 антителами, раскрываемыми в данном документе, т.е., INX420 и INX310, приводили к значительному снижению числа $CD3^+$, $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-эффекторных клеток и повышению Tr1 клеток по сравнению с животными с ксено-GvHD, обработанными контрольным антителом.

[199] На **Фиг. 41A-C** изображены экспериментальные данные, которые демонстрируют, что лечение животных с ксено-GvHD анти-MCT1 антителами, раскрываемыми в данном документе, т.е., INX420, INX413 и INX310, приводили к значительному снижению числа $CD3^+$, $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-эффекторных клеток по сравнению с животными с ксено-GvHD, обработанными контрольным антителом.

[200] На **Фиг. 42** изображены результаты экспериментов, демонстрирующие, что введение анти-MCT1 антител, т.е., INX420 и INX310, в модели на животных с ксено-GvHD приводило к повышению выживаемости, длительной защиты и индукции толерантности по сравнению с животными, обработанными контрольным антителом.

[201] На **Фиг. 43** изображены данные об экспрессии биомаркеров, демонстрирующие, что TIGIT и PD1 экспрессируются на значительном количестве (75%) Т-клеток человека в модели на животных с ксено-GvHD и содержат предполагаемые биомаркеры Tr1 клеток.

[202] На **Фиг. 44** изображены данные об экспрессии биомаркеров, демонстрирующие, что TIGIT и PD1 содержат предполагаемые биомаркеры Tr1

клеток и что предполагаемые Tr1 клетки, которые экспрессируют указанные маркеры, подавляют пролиферацию Т-эффекторных клеток.

[203] На **Фиг. 45** изображены данные об экспрессии биомаркеров, демонстрирующие, что Tr1 клетки экспрессируют высокие уровни гранзима B и не экспрессируют FOXP3 или Blimp1.

[204] На **Фиг. 46A-C** изображены экспериментальные результаты, демонстрирующие, что мыши NSG, обработанные анти-MCT1 антителом (INX420), содержат сниженное количество $hCD3^+$ Т-эффекторных клеток по сравнению с животными, обработанными контрольными антителом.

[205] На **Фиг. 47A-B** изображены экспериментальные результаты, демонстрирующие, что Tr1 клетки подавляют пролиферацию $hCD3^+$ Т-эффекторных клеток и МКПК после стимуляции CD23/CD28.

[206] На **Фиг. 48** схематически изображена кинетика образования Tr1 в модели на животных с ксено-GvHD и продемонстрировано, что обработка анти-MCT1 антителом подавляет пролиферацию в эффекторной фазе.

[207] На **Фиг. 49A-B** изображены экспериментальные данные, относящиеся к *ex vivo* культивированию Tr1 клеток с различными антителами, цитокинами и лигандами. Наблюдаемые результаты демонстрируют, что анти-TIGIT и PVR лиганды не повышали выживаемость. В отличие от этого, обработка ИЛ-2, ИЛ-17 и ИЛ-15 существенно повышала выживаемость *ex vivo* Tr1 клеток (до около 75% выживаемости) дозозависимым образом.

[208] На **Фиг. 50A-B** изображены экспериментальные данные, демонстрирующие эффекты ингибитора MCT1 на основе малой молекулы в отношении кетоза после 8-24 часов голодания в зависимости от уровня кетонов и глюкозы крови.

[209] На **Фиг. 51A-B** изображены экспериментальные данные, демонстрирующие, что ингибитор MCT1 на основе малой молекулы не активирует кетоацидоз после 24 часов голодания и вызывает только минимальное снижение pH (около 0,05) по сравнению с голоданием в отсутствие ингибитора MCT1 на основе малой молекулы.

[210] На **Фиг. 52** изображены остатки MCT1 человека, которые составляют предполагаемый эпитоп, связанный с 4 иллюстративными анти-MCT1 человека антителами в соответствии с данным изобретением, как определено с помощью сканирования аланином. Результаты демонстрируют, что эпитоп, связанный

всеми 4 антителами, содержит ту же самую внеклеточную область МСТ1 человека и по сути те же самые остатки МСТ1 человека.

[211] На **Фиг. 53** и **54** дополнительно изображены специфические остатки МСТ1 человека, которые составляют предполагаемый эпитоп, связанный с 4 анти-МСТ1 человека антителами в соответствии с данным изобретением, как определено с помощью сканирования аланином. В этом случае также результаты демонстрируют, что эпитоп, связанный всеми 4 антителами, содержит ту же самую внеклеточную область МСТ1 человека и по сути те же самые остатки МСТ1 человека.

[212] На **Фиг. 55** изображены результаты экспериментов, которые демонстрируют, что Антитело против МСТ1 человека в соответствии с данным изобретением, которое дополнительно связывает МСТ1 мыши, защищает трансфектанты, экспрессирующие МСТ1 мыши, от токсических эффектов бромпирувата.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[213] Данное изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с транспортером монокарбоксилата 1 («МСТ1»), нуклеиновым кислотам, кодирующим указанные анти-МСТ1 антитела, и их антигенсвязывающим фрагментам, композициям, содержащим указанные анти-МСТ1 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, и способам применения указанных анти-МСТ1 антител, фрагментов антител и композиций в диагностике и терапии.

Мишень антитела: МСТ1

[214] МСТ1 представляет собой многоходовой трансмембранный белок, ответственный за облегченный транспорт критических метаболитов, в том числе продуктов гликолиза. В данной заявке представлены новые анти-МСТ1 антитела, в частности, анти-МСТ1 человека антитела, в том числе антитела, содержащие те же самые CDR, что и любое из антител, идентифицируемых в данной заявке как Ат1-Ат83. До данного изобретения не сообщалось об анти-МСТ1 антителах или фрагментах антител, которые блокируют функцию МСТ1.

[215] Связывание анти-МСТ1 антитела или фрагмента антитела с МСТ1 в соответствии с данным изобретением будет ослаблять, подавлять, уменьшать или иным образом ингибировать, по меньшей мере, одну из функций МСТ1. Что

касается иммунитета, то указанное связывание и ингибирование MCT1 может затем оказывать, по меньшей мере, один супрессорный эффект на аутоиммунитет, например, активированные Т-клетки, В-клетки и/или экспрессию воспалительных цитокинов. Важно отметить, что MCT1 представляют собой единственный иммунологически релевантный переносчик лактата, экспрессируемый на Т- и В-клетках. Анти-MCT1 антитела по данному изобретению, в частности, целенаправленно воздействуют на активированные Т-клетки вследствие перехода к гликолизу во время активации Т-эффекторных клеток, что обеспечивает инновационную и эффективную возможность для контроля аутоиммунных, воспалительных и аллергических патологических состояний. Как показано в разделе Примеры, анти-MCT1 антитела по данному изобретению обеспечивают селективное ингибирование метаболизма лимфоцитов и привлекательный профиль безопасности, особенно в свете данных о недостаточности MCT1 у людей. Блокирование гликолиза лимфоцитов в моделях воспалительных заболеваний, например, моделях системной красной волчанки у склонных к болезням мышей, предупреждает продуцирование ИФНγ в указанных моделях и представляет собой дополнительное доказательство того, что антитела по данному изобретению, которые блокируют гликолиз лимфоцитов безопасным и эффективным образом, имеют высокий потенциал в качестве иммунорегуляторных препаратов.

[216] Анти-MCT1 антитела, которые блокируют или ингибируют функции MCT1, могут быть использованы для снижения аутоиммунитета. В частности, указанные антитела могут быть использованы для подавления нежелательных иммунных реакций человека, таких как аутоиммунные, аллергические заболевания, системная красная волчанка, GVHD, сепсис или нежелательные воспалительные иммунные реакции.

[217] Экспрессия MCT1 также наблюдалась в раковых заболеваниях вследствие особых энергетических потребностей и зависимости от гликолиза опухолевых клеток. Таким образом, антитела по данному изобретению и их антигенсвязывающие фрагменты являются подходящими для лечения рака. Сверхэкспрессия MCT1 в бета-клетках также представляет собой основную причину гиперинсулинизма, индуцированного физической нагрузкой (EIHI), таким образом, что антитела по данному изобретению также можно применять для лечения EIHI.

[218] Примечательно, что в то время как ингибиторы белков MCT на основе малых молекул были ассоциированы с токсичностью в сетчатке, сердце и семенниках в доклинических моделях, люди с недостаточностью MCT1 не имеют токсичности ни в одном из указанных органов (**ссылка 49** и раздел Примеры), что подтверждает высокий профиль безопасности MCT1-специфических антител по данному изобретению. Кроме того, было показано, что индивидуумы с недостаточностью MCT1 являются здоровыми, и указанные выводы подтверждаются данными в примерах, демонстрирующими, что MCT1 не участвует в транспорте лактата в эритроцитах человека.

[219] MCT1 человека имеет следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 1), депонированную в базе данных UniProt с идентификатором P53985-1:

SEQ ID NO:1

[220] MPPAVGGPVGYTPPDGGWGWAVVIGAFISIGFSYAFPKSITVFFKEIEGIFHATT
SEVSWISSIMLAVMYGGGPISSILVNKYGSRIVMIVGGCLSGCGLIAASFCNTVQQLYVC
IGVIGGLGLAFNLNPALTMIGKYFYKRRPLANGLAMAGSPVFLCTLAPLNQVFFGIFGW
RGSFLILGGLLLNCCVAGALMRPIGPKPTKAGKDKSKASLEKAGKSGVKKDLHDANTD
LIGRHPKQEKRSVFQTINQFLDLTLFTHRGFLLYLSGNVIMFFGLFAPLVFLSSYGKSQH
YSSEKSAFLLSILAFVDMVARPSMGLVANTKPIRPRIQYFFAASVVANGVCHMLAPLST
TYVGFCVYAGFFGFAFGWLSSV$_L$FETLMDLVGPQRFSSAVGLVTIVECCPV$_L$LGPPLLG
RLNDMYGDYKYTYWACGVV$_L$IISGIYLFIGMGINYRLLAKEQKANEQKKESKEEETSIDV
AGKPNEVTKAAESPDQKDTDGGPKEEESPV

Связывание с MCT1 и ингибирование функции MCT1

[221] Анти-MCT1 человека по данному изобретению может иметь любую подходящую аффинность и/или авидность по отношению к MCT1. Аффинность относится к силе связывания анти-MCT1 антитела или другого антигенсвязывающего белка с эпитопом или антигенной детерминантой. Как правило, аффинность измеряют применительно к константе диссоциации K_d, определяемой как [Ab] × [Ag]/[Ab-Ag], где [Ab-Ag] представляет собой молярную концентрацию комплекса антитело-антиген, [Ab] представляет собой молярную концентрацию несвязанного антитела, а [Ag] представляет собой молярную концентрацию несвязанного антигена. Константа аффинности K_a определяется как $1/K_d$. Подходящие способы определения специфичности и аффинности связывания пептидов путем конкурентного ингибирования, равновесного диализа

и т.п. можно найти, например, в Harlow, et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988); Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), и Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983).

[222] Аффинность может быть определена с помощью любого из способов, описанных в других разделах данного документа, или их известных эквивалентов в данной области техники. Пример одного способа, который можно использовать для определения аффинности, представлен в анализе Scatchard, Munson & Pollard, *Anal. Biochem.* 107:220 (1980). Аффинность связывания также может быть определена с помощью KINEXA, равновесных способов (например, иммуносорбентного ферментного анализа (ИФА) или радиоиммунологического анализа (RIA)) или анализа кинетики (например, анализ BIAcore™).

[223] В еще одном варианте осуществления изобретения анти-MCT1 антитела и антигенсвязывающие фрагменты, например человеческие, гуманизированные или химеризованные анти-MCT1 антитела или фрагменты антител, могут связываться с MCT1 с аффинностью связывания (K_D), меньшей или равной 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10}, 10^{-10} , 5×10^{-11}, 10^{-11} M, 5×10^{-12}, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M или 10^{-13} M, например, как определено с помощью ИФА, биослойной интерферометрии («BLI»), KINEXA или поверхностного плазмонного резонанса при 25° или 37 °C. В типичном случае анти-MCT1 антитело, представленное в данном изобретении, имеет аффинность в отношении MCT1 в диапазоне от около 10^{-4} до около 10^{-12} M (например, от около 10^{-7} до около 10^{-10} M). Термин иммунореактивный в данном документе в типичном случае относится к связыванию анти-MCT1 антитела с MCT1 с аффинностью ниже, чем около 10^{-4} M. Например, в конкретном аспекте в данном изобретении представлено анти-MCT1 антитело, которое имеет аффинность связывания (K_D), составляющую около 7×10^{-9} M или менее в отношении MCT1, как определено, например, с помощью KINEXA.

[224] Кроме того, анти-MCT1 антитела и антигенсвязывающие фрагменты, например, человеческие, гуманизированные или химеризованные анти-MCT1 антитела или фрагменты антител по данному изобретению, могут включать в себя анти-MCT1 антитела или фрагменты антител, которые связываются с MCT1 со скоростью диссоциации (k_{off}) менее или равной 5×10^{-4} c^{-1}, 10^{-4} c^{-1} , 5×10^{-5} c^{-1} или 10^{-5} c^{-1}.

[225] Авидность относится к общей силе общих взаимодействий между связывающим белком и антигеном (например, общая сила взаимодействий между анти-МСТ1 антителом и МСТ1). Аффинность представляет собой силу общих нековалентных взаимодействий между одним антигенсвязывающим сайтом на антителе или другом связывающем пептиде и одним эпитопом или антигенной детерминантой. Авидность в типичном случае определяется тремя основными факторами: внутренней аффинностью связывающего белка в отношении эпитопа (эпитопов) или антигенной детерминанте (антигенным детерминантам), с которыми он связывается, валентностью антитела или связывающего белка и антигена (например, анти-МСТ1 антитела с валентностью три, четыре или более в типичном случае будут демонстрировать более высокие уровни авидности в отношении антигена, чем бивалентное антитело, и бивалентное антитело может иметь более высокую авидность в отношении антигена, чем одновалентное антитело, особенно когда присутствуют повторяющиеся эпитопы в антигене) и/или геометрическим расположением взаимодействующих компонентов. Авидность в типичном случае измеряется с помощью тех же самых способов, которые используются для оценки аффинности.

[226] Анти-МСТ1 антитела можно охарактеризовать на основании их способности связываться с МСТ1 и тем самым ингибировать одну или несколько функций МСТ1. Такие анти-МСТ1 антитела можно использовать непосредственно в качестве терапевтических агентов в нативной форме. Ингибирующие анти-МСТ1 антитела могут частично или полностью ингибировать различные функции МСТ1, такие как транспорт монокарбоксилатов, ионов и различных других молекул, например, токсинов. В конкретном варианте осуществления антитела по данному изобретению ингибируют МСТ1-опосредованный транспорт лактата. Ингибирование может быть измерено любым подходящим способом. В одном аспекте ингибирование отражается в том, что ингибирующее анти-МСТ1 антитело вызывает, по меньшей мере, около 20%, например, по меньшей мере, около 30%, по меньшей мере, около 40%, по меньшей мере, около 50%, по меньшей мере, около 60%, по меньшей мере, около 75% или более (например, около 25-100%) снижение МСТ1-опосредованного транспорта лактата. Процентное снижение в указанном аспекте может быть определено при рассмотрении влияния анти-МСТ1 антител на транспорт лактата по сравнению с контролем, например, по сравнению с результатами анализов транспорта лактата из клеток, которые не экспрессируют МСТ1, или клеток, не блокированных антителом.

Получение анти-МСТ1 антител

[227] Моноклональные анти-МСТ1 антитела (мАт) и антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с данным изобретением потенциально могут быть получены различными способоами, такими как методология моноклональных антител, например, стандартная методика гибридизации соматических клеток Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495. Также потенциально могут быть использованы другие методики получения моноклонального антитела, например, вирусная или онкогенная трансформация В-лимфоцитов.

[228] Предпочтительной животной системой для получения гибридом является мышиная система. Получение гибридомы у мыши является очень хорошо отработанной процедурой. Протоколы и методики иммунизации для выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в данной области техники. Партнеры слияния (например, клетки миеломы мыши) и процедуры слияния также известны. Химерные или гуманизированные антитела по данному изобретению могут быть получены на основе последовательности мышиного моноклонального антитела, полученного, как описано выше. ДНК, кодирующая иммуноглобулины тяжелой и легкой цепей, может быть получена из мышиной гибридомы, представляющей интерес, и сконструирована таким образом, чтобы содержать не относящиеся к мыши (например, человеческие) последовательности иммуноглобулина с использованием стандартных методик молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела вариабельные области мыши могут быть связаны с константными областями человека с использованием способов, известных в данной области (см., например, патент США № 4816567 в авторстве Cabilly et al.). Чтобы создать гуманизированное антитело, области CDR мыши могут быть вставлены в каркас человека с использованием способов, известных в данной области техники (см., например, патенты США № 5225539 в авторстве Winter и патенты США № 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 в авторстве Queen et al.).

[229] В соответствии, по меньшей мере, с некоторым вариантами осуществления данного изобретения антитела представляют собой моноклональные антитела человека. Такие моноклональные антитела человека, направленные против МСТ1, могут быть получены с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части иммунной системы человека, а не системы мыши, например HuMAb Mouse™, KM Mouse™ (см., например, Lonberg,

et al. (1994) *Nature* 368 (6474):856-859). Соответственно, мыши демонстрируют пониженную экспрессию IgM или K мыши, и в ответ на иммунизацию введенные трансгены тяжелой и легкой цепи человека подвергаются переключению классов и соматической мутации, чтобы генерировать моноклональный IgG или K человека с высокой аффинностью (Lonberg, N. et al. (1994), *выше*; рассмотрено в Lonberg, N. (1994) Handbook of *Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, и Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546). В другом варианте осуществления антитела человека в соответствии, по меньшей мере, с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения могут быть получены с использованием мыши, которая несет последовательности иммуноглобулина человека на трансгенах и трансхомосомах, такой как мышь, которая несет трансген тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека. Такие мыши, называемые в данном документе как «мышами KM™», подробно описаны в публикации PCT WO 02/43478 в авторстве Ishida et al.

[230] Кроме того, в данной области техники доступны альтернативные системы трансгенных животных, экспрессирующих гены иммуноглобулина человека, и их можно использовать для получения анти-MCT1 антител в соответствии, по меньшей мере, с некоторым вариантам осуществления данного изобретения. Например, может быть использована альтернативная трансгенная система, называемая Xenomouse (Abgenix, Inc.); такие мыши описаны, например, в патенте США № 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963 в авторстве Kucherlapati et al.

[231] Более того, альтернативные трансхромосомные системы животных, экспрессирующие гены человеческого иммуноглобулина, доступны в данной области техники и могут быть использованы для получения анти-MCT1 антител в соответствии, по меньшей мере, с некоторым вариантам осуществления данного изобретения. Например, можно использовать мышей, несущих как транхромосому тяжелой цепи человека, так и транхромосому легкой цепи человека, называемых «мышами TC»; такие мыши описаны в Tomizuka et al. (2000) *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 97:722-727. Кроме того, коровы, несущие трансхромосомы человека с тяжелой и легкой цепью, были описаны в данной области техники (Kuroiwa et al. (2002) *Nature Biotechnology* 20: 889-894) и могут быть использованы для

получения анти-MCT1 антител, в соответствии, по меньшей мере, с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения.

[232] Моноклональные антитела человека в соответствии, по меньшей мере, с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения также могут быть получены с использованием способов фагового дисплея для скрининга библиотек генов иммуноглобулина человека. Такие способы фагового дисплея для выделения антител человека известны в данной области техники. См., например, патенты США №№ 5223409; 5403484; и 5571698 в авторстве Ladner et al.; патенты США №№ 5427908 и 5580717 в авторстве Dower et al.; патенты США №№ 5969108 и 6172197 (McCafferty et al.; и патенты США №» 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081 в авторстве Griffiths et al.

[233] Моноклональные антитела человека в соответствии, по меньшей мере, с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения также могут быть получены с использованием мышей SCID, в которых человеческие иммунные клетки были восстановлены таким образом, что ответ на антитела человека может генерироваться при иммунизации. Такие мыши описаны, например, в патентах США №№ 5476996 и 5698767 в авторстве Wilson et al.

[234] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мышей с Ig человека используют для получения анти-MCT1 человека антител в соответствии с данным изобретением, например, путем иммунизации таких мышей очищенным или обогащенным препаратом антигена MCT1 и/или рекомбинантного MCT1 или слитого белка MCT1, как описано Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; и в публикации PCT WO 98/24884 и WO 01/14424. Предпочтительно, чтобы возраст мышей составлял 6-16 недель после первой инфузии. Например, очищенный или рекомбинантный препарат (доза в диапазоне от 5 до 500 мкг) антигена MCT1 может быть использован для иммунизации мышей с Ig человека внутрибрюшинно.

[235] Как правило, трансгенные мыши реагируют, когда их первоначально иммунизируют внутрибрюшинно (IP) антигеном в полном адъюванте Фрейнда, после чего каждую неделю иммунизируют IP (всего до 6 раз) антигеном в неполном адъюванте Фрейнда. В то же время, адъюванты, отличные от Фрейнда, также оказались эффективными. Кроме того, целые клетки в отсутствие адъюванта оказались высокоиммуногенными. Иммунный ответ можно контролировать в течение выполнения протокола иммунизации с помощью

образцов плазмы крови, полученных с помощью ретроорбитальных кровоизлияний. Плазма крови может быть подвергнута скринингу с помощью ИФА, и мышей с достаточными титрами анти-МСТ1 иммуноглобулина человека можно использовать для слияний. У мышей можно вызывать бустинг внутривенно антигеном за 3 дня до умерщвления и удаления селезенки. Ожидается, что для каждой иммунизации может потребоваться 2-3 слияния. Для каждого антигена обычно иммунизируют от 6 до 24 мышей.

[236] В некоторых вариантах осуществления гибридомы, продуцирующие моноклональное анти-МСТ1 антитело человека по данному изобретению, могут быть получены с использованием спленоцитов и/или клеток лимфатических узлов от иммунизированных мышей, которые выделены и слиты с соответствующей иммортализованной клеточной линией, такой как клеточная линия миеломы мыши. Полученные гибридомы могут быть подвергнуты скринингу в отношении продуцирования антиген-специфических антител.

[237] В некоторых вариантах осуществления анти-МСТ1 антитело по данному изобретению может быть получено в трансфектоме клетки-хозяина с использованием, например, комбинации методик рекомбинантной ДНК и способов генной трансфекции, как хорошо известно в данной области техники (например, Morrison, S. (1985) *Science* 229: 1202). Например, для экспрессии антител или их фрагментов антител ДНК, кодирующие частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, могут быть получены стандартными методиками молекулярной биологии (например, амплификацией ПЦР или клонированием кДНК с использованием гибридомы, которая экспрессирует антитело, представляющее интерес), и ДНК могут быть встроены в экспрессионные векторы таким образом, что гены функциониально связаны с последовательностями контроля транскрипции и трансляции. В данном контексте подразумевается, что термин «функционально связанный» означает, что ген антитела лигируют в вектор таким образом, чтобы последовательности контроля транскрипции и трансляции внутри вектора выполняли их предполагаемую функцию, заключающуюся в регулировании транскрипции и трансляции гена антитела. Экспрессионный вектор и последовательности контроля экспрессии выбирают таким образом, чтобы они были совместимыми с применяемой для экспрессии клеткой-хозяином. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела можно вставить в отдельны вектор или, что чаще, оба гена вставляют в один и тот же вектор экспрессии. Гены

антитела вставляют в экспрессионный вектор с помощью стандартных способов (например, путем лигирования комплементарных сайтов рестрикции на фрагменте гена антитела и векторе или путем лигирования «тупых» концов, если сайты рестрикции отсутствуют). Вариабельные области легкой и тяжелой цепи антител, описанных в данном документе, можно использовать для создания полноразмерных генов антител любого изотипа антитела путем их вставки в экспрессионные векторы, уже кодирующие константные области тяжелой цепи и константные области легкой цепи предпочтительного изотипа таким образом, что сегмент V_H функционально связан с сегментами CH в векторе, а сегмент V_L функционально связан с сегментом CL в векторе. В качестве дополнения или в качестве альтернативы, рекомбинантный экспрессионный вектор может кодировать сигнальный пептид, который способствует секреции цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела можно клонировать в вектор так, чтобы сигнальный пептид был связан в рамке считывания с аминоконцом цепи антитела, кодируемого геном. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид из отличного от иммуноглобулина белка).

[238] В некоторых случаях антагонистические анти-MCT1 антитела могут быть получены путем иммунизации животных, например, не относящегося к человеку млекопитающего, не человекообразного примата, птицы или амфибии; например, яванского макака, грызуна, кролика, морской свинки, коровы, лошади, собаки, кошки, курицы, лягушки, вирусоподобными частицами (VLP), которые экспрессируют на своей поверхности интактный белок MCT1, фрагмент MCT1, слитый белок MCT1 или мультимер MCT1 и необязательно другой адъювант. Использование VLP, которые экспрессируют антиген в качестве иммуногенов для генерирования клеточного или гуморального (антительного) иммунного ответа в отношении антигена, экспрессируемого на поверхности VLP, известно в данной области техники. (см., например, патенты США №№ 10138277; 10130696; 10125175; 10086056; 10080796; 10072058; 10046026; 10040830; 9969986; 9957300; 9833504; 9803189; 9637532; 9566327; 9617321; 9585954; 9518096; 9517261; 9381239; 9481875; 9213027; 9296792; 9216229; 8980275; 8889144; 8852604; 8728985; 8691209; 8680244; 8574590; 8529906; 8324149; 8377691; 8158130; 7959928; 7875450; 7641896; 7494656; 7479280; 7320793; 7264810; 7229624; 7138252; 6991795; 6964769; 6534064 и 5667782, среди прочего, указанные патенты включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

Экспрессия анти-MCT1 антител

[239] Подходящая клетка-хозяин, как правило, включает в себя любую клетку, в которой указанные анти-MCT1 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены рекомбинантным путем с использованием доступных методик и материалов. Например, анти-MCT1 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению могут быть получены в генетически сконструированных клетках-хозяевах в соответствии с общепринятыми методиками. Подходящими клетками-хозяевами являются те типы клеток, которые могут быть трансформированы или трансфицированы экзогенной ДНК и выращены в культуре, и включают в себя клетки бактерий, грибов (например, дрожжей) и культивируемые клетки высших эукариот (в том числе культивируемые клетки многоклеточных организмов), в частности, культивируемые клетки млекопитающих, например, клетки человека и не относящихся к человеку млекопитающих. В иллюстративном варианте осуществления указанные антитела могут быть экспрессированы в клетках CHO или клетках HEK-293. Методики манипулирования клонированными молекулами ДНК и введения экзогенной ДНК в различные клетки-хозяева описаны Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), и *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al, editors, New York, NY: Green and Wiley and Sons (1993).

[240] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления антитела могут быть экспрессированы в подходящих для размножения дрожжевых грибах, например, в любых гаплоидных, диплоидных или тетраплоидных дрожжевых грибах, которые можно выращивать в культуре. Дрожжи, используемые в способах экспрессии ферментации, могут существовать в гаплоидной, диплоидной или другой полиплоидной форме. Клетки определенной плоидности могут, при соответствующих условиях, спариваться в течение неопределенного числа поколений в этой форме. Диплоидные клетки также могут спорулировать с образованием гаплоидных клеток. Последовательное спаривание может приводить к тетраплоидным штаммам в результате дальнейшего спаривания или слияния диплоидных штаммов. В данном изобретении представлено использование гаплоидных дрожжей, а также диплоидных или других полиплоидных дрожжевых клеток, полученных, например, путем спаривания или слияния сферопластов. В качестве примера, такие дрожжевые грибы могут

включать в себя представителей семейства Saccharomycetaceae, которое включает в себя роды Arxiozyma; Ascobotryozyma; Citeromyces; Debaryomyces; Dekkera; Eremothecium; Issatchenkia; Kazachstania; Kluyveromyces; Kodamaea; Lodderomyces; Pachysolen; Pichia; Saccharomyces; Saturnispora; Tetrapisispora; Torulaspora; Williopsis; и Zygosaccharomyces. Другие типы дрожжевых грибов, потенциально пригодных в данном изобретении, включают в себя Yarrowia; Rhodosporidium; Кандид; Hansenula; Filobasium; Sporidiobolus; Bullera; Leucosporidium и Filobasidella.

[241] Последовательность, кодирующая полипептид, представляющий интерес, является функционально связанной с транскрипционными и трансляционными регуляторными последовательностями, которые обеспечивают экспрессию полипептида в необходимых клетках-хозяевах, например, клетках дрожжевых грибов или млекопитающих. Указанные векторные компоненты могут включать в себя, но не ограничиваясь ими, одно или несколько из следующего: энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции. Также могут быть включены последовательности для секреции полипептида, например, сигнальная последовательность и т.п. Точка начала репликации, например, точка начала репликации дрожжевого гриба, является необязательной, поскольку экспрессионные векторы часто интегрируются в геном клетки-хозяина. В одном варианте осуществления данного изобретения полипептид, представляющий интерес, является функционально связанным или слитым с последовательностями, обеспечивающими оптимизированную секрецию полипептида из диплоидных клеток дрожжевых грибов.

[242] Промоторы представляют собой нетранслируемые последовательности, расположенные выше (5') по отношению к старт-кодону структурного гена (как правило, в пределах от около 100 до 1000 п.н.), которые контролируют транскрипцию и трансляцию определенных последовательностей нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие промоторы подразделяются на несколько классов: индуцируемые, конститутивные и репрессируемые промоторы (которые повышают уровни транскрипции в ответ на отсутствие репрессора). Индуцируемые промоторы инициируют повышенные уровни транскрипции из ДНК, находящейся под их контролем, в ответ на некоторые изменения в культуральных условиях, например, присутствие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры. Фрагмент

промотора также может выступать в качестве сайта для гомологичной рекомбинации и интеграции экспрессионного вектора в тот же самый сайт в клетке-хозяине, например, в геноме клеток дрожжевых грибов или млекопитающих; в качестве альтернативы селектируемый маркер может быть использован в качестве сайта для гомологичной рекомбинации.

[243] Полипептиды анти-MCT1 антител, представляющие интерес, могут быть получены рекомбинантно не только непосредственно, но также в виде слитого полипептида с гетерологичным полипептидом, например, сигнальной последовательностью или другим полипептидом, имеющим специфический сайт расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Как правило, сигнальная последовательность может представлять собой компонент вектора или она может быть частью последовательности, кодирующей полипептид, которая вставлена в вектор. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность, например, представляет собой последовательность, которая распознается и подвергается процессингу одним из стандартных путей, доступных в клетке-хозяине, например, клетке млекопитающего, клетке насекомого или клетке дрожжевого гриба. Кроме того, эти сигнальные пептидные последовательности могут быть сконструированы для обеспечения повышенной секреции в экспрессионных системах. Сигналы секреции, представляющие интерес, также включают в себя сигнальные последовательности млекопитающих и дрожжевых грибов, которые могут быть гетерологичными по отношению к секретируемому белку, или могут представлять собой нативную последовательность для секретируемого белка. Сигнальные последовательности включают в себя препептидные последовательности, и в некоторых случаях могут включать в себя пропептидные последовательности. Многие такие сигнальные последовательности известны в данной области техники, в том числе сигнальные последовательности, обнаруженные в цепях иммуноглобулина, например последовательность препротоксина K28, PHA-E, FACE, MCP-1 человека, сигнальные последовательности сывороточного альбумина человека, тяжелая цепь человеческого Ig, легкая цепь Ig человека и т.п. Например, см. Hashimoto et. al, *Protein Eng*., 11 (2):75 (1998); and Kobayashi et. al., *Therapeutic Apheresis*, 2(4):257 (1998).

[244] Транскрипция может быть повышена с помощью вставки последовательности активатора транскрипции в вектор. Указанные активаторы

представляют собой действующие в цис-положении элементы ДНК, обычно около от 10 до 300 п.н., которые действуют на промотор для увеличения его транскрипции. Энхансеры транскрипции являются относительно независимыми от ориентации и положения, были обнаружены 5' и 3' относительно единицы транскрипции внутри интрона, а также внутри самой кодирующей последовательности. Энхансер может претерпевать сплайсинг в экспрессионном векторе в положении 5' или 3' относительно кодирующей последовательности, однако, например, располагается в сайте 5' от промотора.

[245] Экспрессионные векторы, используемые в эукариотических клетках-хозяевах, могут также содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности являются общедоступными от 3' до кодона терминации трансляции в нетранслируемых областях эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Указанные области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части мРНК.

[246] При конструировании подходящих векторов, содержащих один или несколько из перечисленных выше компонентов, используют стандартные методики лигирования или способы ПЦР/рекомбинантные способы. Выделенные плазмиды или фрагменты ДНК расщепляются, подгоняются и повторно лигируются в форме, предпочтительной для получения необходимых плазмид, или с помощью методов рекомбинации. Для анализа с целью подтверждения соответствующих последовательностей в сконструированных плазмидах, смеси для лигирования используют для трансформации клеток-хозяев и успешных трансформантов, отобранных по устойчивости к антибиотикам (например, ампициллину или зеоцину), где это необходимо. Плазмиды из трансформантов получают, анализируют путем расщепления рестрикционной эндонуклеазой и/или секвенируют.

[247] В качестве альтернативы рестрикции и лигирования фрагментов могут использоваться способы рекомбинации, основанные на специфических сайтах присоединения («att»), и ферменты рекомбинации, для вставки последовательностей ДНК в вектор. Такие способы описаны, например, Landy, *Ann. Rev. Biochem.*, 58:913-949 (1989); и известны специалистам в данной области техники. В таких способах используют межмолекулярную рекомбинацию ДНК, которая опосредуется смесью рекомбинантных белков, кодируемых лямбда и E.

coli. Рекомбинация происходит между сайтами att на взаимодействующих молекулах ДНК. Описание сайтов att см. Weisberg and Landy, Site-Specific Recombination in Phage Lambda, in *Lambda II*, p. 21 1-250, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press (1983). Сегменты ДНК, фланкирующие сайты рекомбинации, переключаются таким образом, что после рекомбинации сайты att представляют собой гибридные последовательности, состоящие из последовательностей, предоставляемых каждым родительским вектором. Рекомбинация может происходить между ДНК любой топологии.

[248] Сайты att могут быть введены в последовательность, представляющую интерес, с помощью лигирования последовательности, представляющей интерес, в соответствующий вектор; генерирования продукта ПЦР, содержащего сайты att B, с использованием специфических праймеров; генерирование библиотеки кДНК, клонированной в соответствующий вектор, содержащий сайты att; и т.п.

[249] Фолдинг, используемый в данном документе, относится к трехмерной структуре полипептидов и белков, при этом взаимодействия между аминокислотными остатками влияют на стабилизацию структуры. Несмотря на то, что нековалентные взаимодействия являются важными для определения структуры, обычно белки, представляющие интерес, будут иметь внутри- и/или межмолекулярные ковалентные дисульфидные связи, образованные двумя остатками цистеина. Для встречающихся в природе белков и полипептидов или их производных и их вариантов, правильное сворачивание в типичном случае представляет собой упорядочивание, которое приводит к оптимальной биологической активности, и его можно удобно контролировать с помощью анализов в отношении активности, например, связывание лигандов, ферментативную активность и т.д.

[250] В некоторых случаях, например, когда необходимый продукт имеет синтетическое происхождение, анализы, основанные на биологической активности, будут менее значимыми. Соответствующий фолдинг таких молекул может быть определен на основе физических свойств, энергетических соображений, модельных исследований и т.п.

[251] Хозяин экспрессии может быть дополнительно модифицирован с помощью введения последовательностей, кодирующих один или несколько ферментов, которые усиливают фолдинг и образование дисульфидных связей, т.е., фолдазы, шаперонины, протеиндисульфидизомеразы и т.д. Такие последовательности

могут быть конститутивно или индуцибельно экспрессироваться в клетке-хозяине дрожжевых грибов, с использованием векторов, маркеров и т. д., как известно в данной области техники. Предпочтительно последовательности, содержание регуляторные элементы транскрипции, достаточные для необходимого паттерна экспрессии, стабильно интегрированы в геном клетки-хозяина посредством целевой методологии.

[252] Например, эукариотическая протеиндисульфидизомераза («PDI») представляет собой не только эффективный катализатор окисления цистеина белка и изомеризации дисульфидной связи, но также проявляет активность шаперона. Коэкспрессия PDI может способствовать продуцированию активных белков, имеющих множественные дисульфидные связи. Также представляет интерес экспрессия белка, связывающего тяжелую цепь иммуноглобулина («BIP»); циклофилина; и т.п. В одном варианте осуществления данного изобретения каждый из родительских штаммов гаплоидов экспрессирует отдельный фермент фолдинга, например, один штамм может экспрессировать BIP, а другой штамм может экспрессировать PDI или их комбинации.

[253] Культивируемые клетки млекопитающих также являются предпочтительными иллюстративными хозяевами для продуцирования раскрываемых анти-MCT1 антител и их антигенсвязывающих фрагментов. Как уже упоминалось, клетки CHO являются особенно подходящими для экспрессии антител. В данной области техники известно множество процедур для получения моноклональных антител в клетках млекопитающих. (*см.*, Galfre, G. and Milstein, C, *Methods Enzym.* , 73:3-46, 1981; Basalp et al., Turk. *J. Biol* , 24: 189-196, 2000; Wurm, F.M., *Nat. Biotechnol* , 22: 1393-1398, 2004; и Li et al., *mAbs*, 2(5):466-477, 2010). Как более подробно упомянуто ниже, общие линии клеток-хозяев, используемые в схемах получения моноклональных антител млекопитающих, включают, но не ограничиваются ими, клеточную линию эмбриональных ретинобластов человека PER.C6® (Crucell NV, Лейден, Нидерланды), клетки мышиной миеломы NSO (Medical Research Council, Лондон, Великобритания), линия клеток почек обезьяны CV1, линия эмбриональных клеток почки человека 293, линию клеток почки хомяка BHK, линия клеток почки африканской зеленой обезьяны VERO, линию клеток рака шейки матки человека HELA, клетки почки собаки MDCK, клетки печени крысы линии Buffalo BRL, клетки легкого человека W138, клетки печени человека HepG2, клетки опухоли молочной железы мыши MMT, клетки TRI, клетки

MRC5, клетки Fs4, клетки миеломы или лимфомы или клетки яичника китайского хомячка (Cricetulus griseus) (CHO) и т.п. Многие другие субклоны или субклеточные линии клеток CHO, известные в данной области техники, которые пригодны и оптимизированы для продуцирования рекомбинантных моноклональных антител, таких как клеточная линия DP12 (CHO Kl dhfr-). Клетки NSO представляют собой не секретирующий Ig, не синтезирующий легкие цепи субклон клеток NS-1, которые устойчивы к азагуанину. Другие клетки китайского хомячка и CHO являются коммерчески доступными (от ATCC и т.д.), в том числе CHO-DXB11 (CHO-DUKX), CHO-pro3, CHO-DG44, CHO 1-15, CHO DP-12, Lec2, M1WT3, Lec8 , pgsA-745 и т.п., при этом все они являются генетически измененными с тем, чтобы оптимизировать клеточную линию для различных параметров. Моноклональные антитела обычно получают с использованием способа периодической подпитки, посредством которого цепи моноклональных антител экспрессируются в клеточной линии млекопитающих и секретируются в среду для культивирования ткани в биореакторе. Среду (или подпитку) непрерывно подают в биореактор для максимизации экспрессии рекомбинантных белков. Рекомбинантное моноклональное антитело затем очищают от собранной среды. В некоторых обстоятельствах необходимы дополнительные этапы для повторной сборки антител путем восстановления дисульфидных связей и т.д. Такие способы получения могут быть масштабированы до 10000 л в одной партии или более. В настоящее время обычной практикой является получение до 20 пг/клетка/сутки за счет использования таких клеточных линий и методологий, обеспечивающих титры до 10 г/л или более, составляющие от 15 до 100 кг из биореакторов от 10 кл до 25 кл. (Li et al, 2010). Различные детали этой методологии получения, в том числе клонирование полинуклеотидов, кодирующих антитела в экспрессионные векторы, трансфекцию клеток этими экспрессионными векторами, отбор трансфицированных клеток и экспрессию и очистку рекомбинантных моноклональных антител из этих клеток, представлены ниже.

[254] Для рекомбинантной продукции анти-MCT1 антитела или антигенсвязывающего фрагмента в клетках млекопитающих нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело или его фрагмент, как правило, встраивают в реплицируемый вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. ДНК, кодирующая антитело, легко выделяется или синтезируется с использованием общепринятых процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с ДНК,

кодирующей тяжелые и легкие цепи антитела). Компоненты вектора, как правило, включают в себя, но не ограничиваясь ими, одно или несколько из следующего: сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции. Выбор промоторов, терминаторов, селектируемых маркеров, векторов и других элементов является предметом стандартного конструирования на уровне обычных специалистов в данной области техники. Многие такие элементы известны в данной области техники и доступны через коммерческих поставщиков.

[255] Антитела по данному изобретению могут быть получены рекомбинантно не только непосредственно, но также в виде слитого полипептида с гетерологичным полипептидом, который представляет собой, например, сигнальную последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Например, выбранная гомологичная или гетерологичная сигнальная последовательность представляет собой последовательность, которая распознается и претерпевает процессинг (т.е., расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. При экспрессии клеток млекопитающих доступны сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидеры, например, gD сигнал вируса простого герпеса.

[256] Такие экспрессионные векторы и клонирующие векторы, как правило, содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая позволяет вектору реплицироваться в одной или нескольких выбранных клетках-хозяевах. В типичном случае в клонирующих векторах указанная последовательность представляет собой последовательность, которая позволяет вектору реплицироваться независимо от хромосомной ДНК хозяина, и включает в себя точки начала репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для различных бактерий, дрожжевых грибов и вирусов, например, точка начала репликации из плазмиды pBR322 является подходящей для большинства грамотрицательных бактерий, точка начала репликации плазмиды 2mu является подходящей для дрожжевых грибов, а различные точки начала репликации вирусов (вируса обезьян 40 («SV40»), вируса полиомы, аденовируса, вирус везикулярного стоматита («VSV») или бычьего папилломавируса («BPV») являются пригодными для клонирования

векторов в клетках млекопитающих. Как правило, компонент точки начала репликации не требуется для экспрессионных векторов млекопитающих (точка начала репликации SV40 в типичном случае может использоваться только потому, что она содержит ранний промотор).

[257] Указанные векторы в типичном случае содержат селективный ген, также называемый селектируемым маркером. Иллюстративные селективные гены кодируют белки, которые (a) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (b) дополняют ауксотрофные виды недостаточности или (c) обеспечивают важными питательными веществами, недоступными из сложных сред, например, ген, кодирующий D-аланинрацемазу для Bacilli.

[258] В одном примере схемы селекции используется лекарственный препарат для остановки роста клетки-хозяина. Отбор по чувствительности к лекарственному препарату, как правило, используется для отбора культивируемых клеток млекопитающих, в которые была вставлена чужеродная ДНК. Такие клетки обычно называют «трансфектантами». Клетки, которые были культивированы в присутствии селективного агента и способны передавать ген, представляющий интерес, своему потомству, называются «стабильными трансфектантами». Примеры такого доминантного отбора используют лекарственные препараты неомицин, микофеноловую кислоту и гигромицин. Типичным селектируемым маркером является ген, кодирующий устойчивость к антибиотику неомицину. Отбор проводят в присутствии лекарственного препарата типа неомицина, такого как G-418 или т.п. Те клетки, которые успешно трансформированы гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий устойчивость к лекарственным препаратам, и, таким образом, выживают в режиме селекции.

[259] Системы отбора могут также использоваться для повышения уровня экспрессии гена, представляющего интерес, при этом процесс называется «амплификацией». Амплификация трансфектантов в типичном случае происходит путем культивирования клеток в присутствии низкого уровня селективного агента и затем повышения количества селективного агента для отбора клеток, которые продуцируют высокие уровни продуктов введенных генов. Примерами подходящих селектируемых маркеров для клеток млекопитающих являются маркеры, которые позволяют идентифицировать клетки, способные поглощать

нуклеиновую кислоту антитела, такую как дигидрофолатредуктаза («DHFR»), тимидинкиназа, металлотионеин-I и -II, например, гены металлотионеина приматов, аденозиндеаминаза, орнитиндекарбоксилаза и др.

[260] Например, амплифицируемый селектируемый маркер для клеток млекопитающих представляет собой дигидрофолатредуктазу, которая придает устойчивость к метотрексату. Другие гены устойчивости к лекарственным препаратам (например, устойчивости к гигромицину, устойчивости к многим лекарственным препаратам, пуромицинацетилтрансфераза) также могут быть использованы. Клетки, трансформированные геном селекции DHFR, сначала идентифицируют путем культивирования всех трансформантов в культуральной среде, которая содержит метотрексат («MTX»), конкурентный антагонист DHFR. Подходящей клеткой-хозяином при использовании DHFR дикого типа является клеточная линия яичника китайского хомячка («CHO»), с недостаточностью активности DHFR.

[261] В качестве альтернативы, клетки-хозяева (особенно хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR), трансформированные или совместно трансформированные последовательностями ДНК, кодирующими антитело, белок DHFR дикого типа и другой селектируемый маркер, такой как аминогликозид-3'-фосфотрансфераза («APH»), могут быть выбранны путем роста клеток в среде, содержащей селективный агент для селектируемого маркера, такого как аминогликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин или G-418. См. патент США № 4965199.

[262] Указанные векторы могут содержать энхансерную последовательность, которая облегчает транскрипцию ДНК, кодирующей антитело. Многие энхансерные последовательности известны из генов млекопитающих (например, глобина, эластазы, альбумина, альфа-фетопротеина и инсулина). Часто используемый энхансер представляет собой энхансер, полученный из вируса эукариотических клеток. Его примеры включают в себя энхансер SV40 на участке поздней точки начала репликации (п.о. 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на участке поздней точки начала репликации и энхансеры аденовируса (*см.* также Yaniv, *Nature*, 297:17-18, 1982, в отношении энхансерных элементов для активации эукариотических промоторов). Энхансер может претерпевать сплайсинг в вектор в положении 5' или 3'

относительно последовательности, кодирующей антитело, но, например, расположен в сайте 5' от промотора.

[263] Экспрессионные векторы и клонирующие векторы также, как правило, содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и является функционально связанным с нуклеиновой кислотой антитела. Промоторные последовательности известны для эукариот. Практически все эукариотические гены имеют область с высоким содержанием АТ, расположенную примерно на 25-30 оснований выше от сайта, в котором начинается транскрипция. Другой последовательностью, встречающейся на 70-80 оснований выше от начала транскрипции многих генов, является область CNCAAT, где N может представлять собой любой нуклеотид. На 3'-конце большинства эукариотических генов находится последовательность AATAAA, которая может представлять собой сигнал для добавления хвоста поли-А к 3'-концу кодирующей последовательности. Все из указанных последовательностей соответствующим образом вставлены в эукариотические экспрессионные векторы.

[264] Транскрипция антител из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (такой как аденовирус 2), BPV, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и, в большинстве случаев, например, SV40, из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, из промотора актина или промотора иммуноглобулина, из промоторов белков теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клеток-хозяев.

[265] Ранние и поздние промоторы вируса SV40 удобно получать в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит точку начала репликации вируса SV40. Немедленно-ранний промотор цитомегаловируса человека удобно получать в виде рестрикционного фрагмента HindIII E. Система для экспрессии ДНК у хозяев-млекопитающих с использованием BPV в качестве вектора раскрыта в патенте США № 4419446. Модификация указанной системы описана в патенте США № 4601978. См. также Reyes et al., *Nature*, 297:598-601 (1982) в отношении экспрессии кДНК бета-интерферона человека в клетках мыши под контролем промотора тимидинкиназы из вируса простого герпеса. В качестве альтернативы, длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса может быть использован в качестве промотора.

[266] Могут быть использованы сильные промоторы транскрипции, такие как промоторы из SV40, цитомегаловируса или вируса миелопролиферативной саркомы. См., например, патент США № 4956288 и публикацию патента США № 20030103986. Другие подходящие промоторы включают в себя гены металлотионеина (патенты США № 4579821 и 4601978) и главный поздний промотор аденовируса. Экспрессионные векторы для использования в клетках млекопитающих включают в себя pZP-1, pZP-9 и pZMP21, которые были депонированы в Американской коллекции типовых культур, 10801 University Blvd., Манассас, Вирджиния, США, под номерами доступа 98669, 98668 и PTA-5266 соответственно, а также производные указанных векторов.

[267] Экспрессионные векторы, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (дрожжевых грибах, грибах, насекомых, растениях, животных, людях или клетки с ядром из другого многоклеточного организма), также, как правило, содержат последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно доступны от 5', а иногда и от 3' нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Указанные области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части мРНК, кодирующей антитело. Одним из пригодных компонентов терминации транскрипции является область полиаденилирования бычьего гормона роста. См. WO 94/11026 и экспрессионный вектор, раскрываемый в ней.

[268] Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии антител по данному изобретению включают в себя клетки прокариотов, дрожжевых грибов или высших эукариотов, описанные выше. В то же время наибольший интерес вызывают клетки позвоночных, а размножение клеток позвоночных в культуре стало стандартной процедурой. Примерами пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-1 (№ в ATCC CRL 1650); и COS-7, ATCC CRL 1651); линия почки эмбриона человека (293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре (№ в ATCC CRL 1573; Graham et al., *J. Gen. Virol,* 36:59-72 (1977)); клетки почки детенышей хомяка (BHK, № в ATCC CCL 10, № в ATCC CRL 1632; BHK 570, № в ATCC CRL 10314); клетки CHO (CHO-K1, № в ATCC CCL 61; CHO-DG44, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216-4220 (1980)), клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)), клетки почки обезьяны (CV1, № в

ATCC CCL 70), клетки почки африканской зеленой обезьяны (VERO-76, № в ATCC CRL-1587), клетки рака шейки матки человека (HELA, № в ATCC CCL 2), клетки почки собаки (MDCK, № в ATCC CCL 34), клетки печени крыс линии Buffalo (BRL 3A, № в ATCC CRL 1442), клетки легкого человека (W138, № в ATCC CCL 75), клетки печени человека (Hep G2, HB 8065), клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, № в ATCC CCL51), клетки TRI (Mather et al., Annals NY Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4; и линия гепатомы человека (Hep G2). Дополнительные подходящие линии клеток известны в данной области техники и доступны из общественных депозитариев, таких как Американская коллекция типовых культур, Манассас, Вирджиния.

[269] Клетки-хозяева трансформируют описанными выше экспрессионными или клонирующими векторами для получения антител и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных в зависимости от необходимости для индукции промоторов, выбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих необходимые последовательности, как обсуждалось выше.

[270] Клетки-хозяева млекопитающих, используемые для получения антитела по данному изобретению, могут культивироваться в различных средах. Коммерчески доступные носители, такие как среда Хэма F10 (Sigma-Aldrich Corporation, Сент-Луис, Миссури), минимальная питательная среда ((«MEM» (Sigma-Aldrich Corporation, Сент-Луис, Миссури), среда 1640 от Roswell Park Memorial Institute («RPMI-1640», Sigma-Aldrich Corporation, Сент-Луис, Миссури) и модифицированная по Дульбекко среда Игла ((«DMEM», Sigma-Aldrich Corporation, Сент-Луис, Миссури) подходят для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, любой из носителей, описанных в Ham et al., *Meth. Era.*, 58:44 (1979); Barnes et al., *Anal. Biochem.*, 102:255 (1980); патентах США №№ 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; или 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195; или патенте США после повторной экспертизы № 30985, может использоваться в качестве питательной среды для клеток-хозяев. Любая из этих сред может при необходимости дополняться гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как лекарственный препарат гентамицин), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в

микромолярном диапазоне), а также глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие необходимые добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, которые известны специалистам в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., представляют собой условия, которые ранее использовались в отношении клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и будут очевидны для специалиста в данной области техники. Способы разработки и оптимизации сред и условий культивирования известны в данной области техники. (*см.* Gronemeyer et al., *Bioengineering*, 1 (4):188-212, 2014).

[271] После того, как условия культивирования оптимизированы и выбран предпочтительный клон клеточной линии, указанные клетки культивируют (либо адгезивные клетки, либо суспензионные культуры), чаще всего в периодическом процессе с подпиткой в биореакторе (многие модели имеются в продаже), который включает в себя непрерывную подпитку клеточной культуры средой и подпиткой, оптимизированными для конкретной клеточной линии, выбранной и отобранной для указанной цели. (*см.,* Butler, M., *Appl. Microbiol. Biotechnol* , 68:283-291, 2005; и Kelley, B., *mAb,* l(5):443-452, 2009). Также доступны перфузионные системы, в которых среда и подпитка непрерывно поступают в культуру, в то время как из биореактора извлекается тот же самый объем среды. (Wurm, 2004). Синтетические среды, также являющиеся коммерчески доступными, доступны для выращивания клеток в культуре с периодической подпиткой, при этом устраняется возможность контаминации из внешних источников, таких как при использовании компонентов животного происхождения, таких как бычий сывороточный альбумин и т.д. В то же время, не содержащие компонентов животного происхождения гидролизаты являются коммерчески доступными, чтобы способствовать повысить плотность клеток, жизнеспособность и продуктивность культуры. (Li et al., 2010). Многие исследования были проведены с целью оптимизации среды для культивирования клеток, в то числе значительного внимания к свободному пространству, доступному в роллерных флаконах, окислительно-восстановительным потенциалам во время фаз роста и экспрессии, присутствию восстановителей для поддержания дисульфидных связей во время производства и т.д. (*см.,* например, Hutterer et al., *mAbs*, 5(4):608-613, 2013; и Mullan et al, *BMC Proceed.* , 5(Suppl 8):P110, 2011). Различные методологии были разработаны для устранения возможности нежелательного окисления во время получения рекомбинантных моноклональных антител. (*см.*, например, патент США №

8574869). Культивируемые клетки можно выращивать путем непрерывной подкормки питательными веществами или в виде раздельно вводимых количеств. Часто различные параметры процесса, такие как концентрации клеток, pH, температура, CO_2, dO2, осмоляльность, количество метаболитов, таких как глюкоза, лактат, глутамин и глутамат и т.п., контролируют с использованием зондов в процессе роста клеток либо в режиме онлайн в результате прямого подключения к калиброванным анализаторам, либо в режиме офлайн в результате вмешательства операторов. Стадия культивирования также обычно включает обеспечение того, чтобы растущие в культуре клетки поддерживали трансфицированные рекомбинантные гены любыми способами, известными в данной области техники для отбора клеток.

[272] После ферментации, т.е., после достижения максимального роста клеток и экспрессии рекомбинантного белка, за стадией культивирования обычно следует стадия сбора, посредством которой клетки отделяются от среды и, таким образом, получается собранная среда для культивирования клеток. (см., Liu et al, *mAbs*, 2(5):480-499, 2010). В типичном случае проводят различные стадии очистки, в том числе колоночную хроматографию и т.п., для культивирования, чтобы отделить рекомбинантное моноклональное антитело от компонентов клетки и компонентов среды для культивирования клеток. Точные этапы очистки, необходимые для указанной фазы получения рекомбинантных моноклональных антител, зависят от сайта экспрессии белков, т.е., в цитозоле самих клеток, или от более предпочтительного пути белка, экскретируемого в среду для культивирования клеток. Различные клеточные компоненты могут быть разделены с использованием методик, известных в данной области техники, таких как методики дифференциального центрифугирования, гравитационное осаждение клеток и/или методики эксклюзионной хроматографии/фильтрации, которые могут включать в себя микрофильтрацию с тангенциальным потоком или глубинную фильтрацию. (*см.*, Pollock et al, *Biotechnol. Bioeng.*, 110:206-219, 2013, и Liu et al, 2010). Центрифугирование клеточных компонентов может быть достигнуто в больших масштабах путем использования центрифуг с непрерывным дисковым стеком с последующим осветлением с использованием глубинных и мембранных фильтров. (см., Kelley, 2009). Чаще всего после очистки рекомбинантный белок дополнительно очищают хроматографией с использованием белка А в связи с высокой аффинностью белка А к Fc-домену антител, и в типичном случае это происходит с использованием низкого значения pH/стадии элюирования с

подкислением (в типичном случае стадия подкисления объединяется с предшествующим этапом инактивации вируса). Стадии флокуляции и/или осаждения с использованием кислотных или катионных полиэлектролитов также могут быть использованы для отделения клеток животных в суспензионных культурах от растворенных белков. (Liu et al, *mAbs*, 2(5):480-499, 2010). Наконец, анионо- и катионообменная хроматография, хроматография гидрофобного взаимодействия («HIC»), хроматография гидрофобной индукции заряда (HCIC), хроматография на гидроксиапатите с использованием керамического гидроксиапатита ($Ca_5(PO_4)_3OH)_2$, и комбинации этих методик в типичном случае используются для полировки раствора рекомбинантного моноклонального антитела. Окончательный состав и концентрация необходимого моноклонального антитела могут быть достигнуты с использованием методик ультрацентрифугирования. Выходы после очистки обычно составляют от 70 до 80%. (Kelley, 2009).

Антиидиотипические антитела

[273] Другой аспект изобретения относится к антиидиотипическим антителам и анти-антиидиотипическим антителам. Антиидиотипическое антитело представляет собой антитело, которое распознает детерминанты другого антитела (целевого антитела). Как правило, антиидиотипическое антитело распознает детерминанты антигенсвязывающего сайта целевого антитела. В типичном случае целевое антитело представляет собой моноклональное антитело. Антиидиотипическое антитело, как правило, получают путем иммунизации животного (в частности, мышей) того же самого вида и генетического типа, что и источник целевого моноклонального антитела, целевым моноклональным антителом. Иммунизированное животное генерирует иммунный ответ на идиотипические детерминанты целевого моноклонального антитела и продуцирует антитела против идиотипических детерминант целевого моноклонального антитела. Антителопродуцирующие клетки, такие как клетки селезенки, иммунизированного животного могут использоваться для генерирования антиидиотипических моноклональных антител. Кроме того, антиидиотипическое антитело также может быть использовано для иммунизации животных с целью получения анти-антиидиотипического антитела. Указанные иммунизированные животные могут быть использованы для генерирования анти-

антиидиотипических моноклональных антител с использованием стандартных методик. Анти-антиидиотипические антитела могут связываться с тем же самым эпитопом, что и исходное целевое моноклональное антитело, используемое для получения антиидиотипического антитела. Анти-антиидиотипические антитела представляют собой другие моноклональные антитела с той же самой антигенной специфичностью, что и исходное целевое моноклональное антитело.

[274] Если связывание антиидиотипического антитела с целевым антителом ингибируется соответствующим антигеном целевого антитела, и если антиидиотипическое антитело индуцирует ответ антитела с той же самой специфичностью, что и целевое антитело, оно имитирует антиген целевого антитела. Такое антиидиотипическое антитело представляет собой «антиидиотип, несущий внутренний образ» и способно индуцировать ответ антитела так, как если бы оно было исходным антигеном. (Bona and Kohler, Anti-Idiotypic Antibodies And Internal Image, in *Monoclonal And Anti-Idiotypic Antibodies: Probes For Receptor Structure And Function,* Venter J. C., Frasser, C. M., Lindstrom, J. (Eds.), Alan R. Liss, N. Y., 1984. pp 141-149). Было показано, что вакцины, содержащие антиидиотипические антитела, несущие внутренний образ, индуцируют защитные реакции против вирусов, бактерий и паразитов (Kennedy et al., (1986) *Science*, 232:220-223; McNamara et al. (1985) *Science* 226:1325-1326). Также было показано, что антиидиотипические антитела, несущие внутренний образ, индуцируют иммунитет к антигенам, связанным с опухолью (Raychauhuri el al. (1986) *J. Immunol.* 137:1743-1749; Raychauhuri et al. (1987) *J. Immunol.* 139:3902-3910; Bhattacharya-Chatterjee et al. (1987) *J. Immunol.* 139:1354-1360; Bhattacharya-Chatterjee et al. (1988) J. Immunol. 141:1398-1403; Herlyn, D. et al. (1989) *Intern. Rev.* Immunol. 4:347-357; Chen, Z.-J et al. (1990) *Cell Imm. Immunother.* Cancer 351-359; Herlyn, D. et al. (1991) *In Vivo* 5:615-624; Furuya et al. (1992) *Anticancer Res.* 12:27-32; Mittelman A. et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 89:466-470; Durrant, L. G. et al. (1994) *Cancer Res.* 54:4837-4840; Mittelman, A. et al. (1994) *Cancer Res* 54:415-421; Schmitt, H. et al. (1994) Hybridoma 13:389-396; Chakrobarty, M. et al. (1995) *J. Immunother.* 18:95-103; Chakrobarty, M. et al. (1995) *Cancer Res.* 55:1525-1530; Foon, K. A. et al. (1995) *Clin. Cancer Res.* 1:1205-1294; Herlyn, D, et al. (1995) *Hybridoma* 14:159-166; Sclebusch, H. et al. (1995) *Hybridoma* 14:167-174; Herlyn, D. et al. (1996) *Cancer Immunol Immunother.* 43:65-76).

[275] Антиидиотипические антитела к МСТ1 могут быть получены, например, путем иммунизации животного, такого как мышь, иммуногенным количеством композиции, содержащей МСТ1 или его иммуногенные участки, содержащие, по меньшей мере, один антигенный эпитоп МСТ1. Композиция также может содержать подходящий адъювант и любой носитель, необходимый для обеспечения иммуногенности. Моноклональные антитела, распознающие МСТ1, могут быть получены из клеток иммунизированного животного, как описано выше. Моноклональное антитело, распознающее эпитоп МСТ1, затем отбирают и используют для приготовления композиции, содержащей иммуногенное количество анти-МСТ1 антитела моноклонального антитела. В типичном случае в подходящем адъюванте достаточно дозы от 25 до 200 мкг очищенного моноклонального антитела к МСТ1.

[276] Животных можно иммунизировать 2-6 раз с интервалами 14-30 дней между дозами. В типичном случае животных иммунизируют любым подходящим путем введения, таким как внутрибрюшинный, подкожный, внутривенный или их комбинация. Продуцирование антиидиотипических антител можно контролировать в течение периода иммунизации с использованием стандартных методов иммуноанализа. Животных с подходящими титрами антител, реагирующих с целевыми моноклональными антителами, можно повторно иммунизировать моноклональным антителом, используемым в качестве иммуногена, за три дня до сбора антителопродуцирующих клеток. Предпочтительно используют клетки селезенки, хотя могут быть выбраны другие клетки, продуцирующие антитела. Антитело-продуцирующие клетки собирают и сливают с миеломными клетками для получения гибридом, как описано выше, и отбирают подходящие антиидиотипические антитело-продуцирующие клетки.

[277] Анти-идиотипические антитела продуцируются с помощью другого цикла иммунизации и получения гибридом с использованием антиидиотипического моноклонального антитела в качестве иммуногена.

Конкуренция, картирование эпитопов и структурное сходство

[278] Идентификация одного или нескольких антител, которые связываются по сути или практически с тем же самым эпитопом, что и моноклональные антитела, описанные в данном документе, может быть легко определена с помощью сканирования аланином. кроме того, любом из множества иммунологических

скрининговых анализов, в которых можно оценить конкуренцию антител. Ряд таких анализов обычно практикуется и хорошо известен в данной области техники (см., например, патент США № 5660827, выданный 26 августа 1997 г., который специально включен в данное описание посредством ссылки). Понятно, что фактическое определение эпитопа, с которым связывается антитело, описанное в данном документе, никоим образом не требуется для идентификации антитела, которое связывается с тем же самым или по сути тем же или перекрывающимся эпитопом, что и моноклональное антитело, описанное в данном документе.

[279] Например, если исследуемые тестируемые антитела получают от разных исходных животных или даже имеют другой изотип Ig, можно использовать простой конкурентный анализ, в котором контрольное антитело смешивают с тестируемым антителом и затем наносят на образец, содержащий MCT1. Протоколы, основанные на ИФА, радиоиммуноанализах, вестерн-блоттинге и использовании анализа BIACORE® (GE Healthcare Life Sciences, Марлборо, Массачусетс), являются подходящими для использования в таких простых конкурентных исследованиях.

[280] В определенных вариантах осуществления контрольное анти-MCT1 антитело предварительно смешивают с различными количествами тестируемого антитела (например, в соотношениях около 1:1, 1:2, 1:10 или около 1:100) в течение периода время до нанесения на образец антигена MCT1. В других вариантах осуществления контрольное и варьирующее количества тестируемого антитела можно просто добавлять отдельно и смешивать во время воздействия образца антигена MCT1. При условии, что связанные антитела можно отличить от свободных антител (например, с помощью методик разделения или промывания для удаления несвязанных антител), а контрольное антитело от тестируемого антитела (например, с помощью видоспецифичных или изотип-специфических вторичных антител или путем специфической маркировки контрольного антитело детектируемой меткой), можно определить, снижает ли тестируемое антитело связывание контрольного антитела с антигеном MCT1, указывая на то, что тестируемое антитело распознает по сути тот же самый эпитоп, что и контрольное анти-MCT1 антитело. Связывание (меченого) контрольного антитела в присутствии полностью нерелевантного антитела (которое не связывает MCT1) может выступать в качестве контрольного высокого значения. Низкое контрольное значение может быть получено путем инкубации меченого контрольного антитела

с тем же самым, но немеченым контрольным антителом, при этом может возникнуть конкуренция и уменьшиться связывание меченого антитела. В тестовом анализе значительное снижение реактивности меченого антитела в присутствии тестируемого антитела указывает на тестируемое антитело, которое распознает по сути тот же самый эпитоп, т.е. эпитоп, который конкурирует с меченым контрольным антителом. Например, любое тестируемое антитело, которое уменьшает связывание контрольного антитела с МСТ1, по меньшей мере, на около 50%, например, по меньшей мере, на около 60% или более, например, по меньшей мере, на около 70% (например, около 65-100%), при любом соотношении тестируемого антитела от примерно 1:1 или 1:10 до примерно 1:100 считается антителом, которое связывается по сути с тем же самым или перекрывающимся эпитопом или детерминантой, что и контрольное антитело.

[281] Предпочтительно, чтобы такое тестируемое антитело уменьшало связывание контрольного антитела с антигеном МСТ1, например, по меньшей мере, на около 50%, по меньшей мере, на около 60%, по меньшей мере, на около 80% или, по меньшей мере, на около 90% (например, на около 95%) от связывания контрольного антитела, наблюдаемого в отсутствие тестируемого антитела.

[282] Можно также предпочтительно использовать простой конкурентный анализ, в котором тестируемое антитело наносят в насыщающей концентрации на поверхность, на которой иммобилизован МСТ1 (или его часть). Поверхность в простом конкурентном анализе представляет собой, например, чип BIACORE® (GE Healthcare Life Sciences, Марлборо, Массачусетс) (или другую среду, подходящую для анализа поверхностного плазмонного резонанса («SPR»)). Измеряется связывание контрольного антитела, которое связывает МСТ1 с поверхностью, покрытой МСТ1. Указанное связывание с МСТ1-содержащей поверхностью только контрольного антитела сравнивают со связыванием контрольного антитела в присутствии тестируемого антитела. Значительное снижение связывания с поверхностью, содержащей МСТ1, контрольным антителом в присутствии тестируемого антитела указывает на то, что тестируемое антитело распознает по сути тот же самый эпитоп, что и контрольное антитело, так что тестируемое антитело «конкурирует» с контрольным антителом. Любое тестируемое антитело, которое снижает связывание контрольного антитела, по меньшей мере, на около 20% или более, по меньшей мере, на около 40%, по

меньшей мере, на около 50%, по меньшей мере, на около 70% или более, можно считать антителом, которое связывается по сути с тем же самым эпитопом или детерминантой, что и контрольное антитело. Предпочтительно, чтобы такое тестируемое антитело уменьшало связывание контрольного антитела с MCT1, по меньшей мере, на около 50% (например, по меньшей мере, на около 60%, по меньшей мере, на около 70% или более). Понятно, что порядок контрольных и тестируемых антител может быть обратным; т.е., контрольное антитело может быть сначала связано с поверхностью, а затем после этого в конкурентном анализе тестируемое антитело приводится в контакт с поверхностью. В качестве альтернативы, антитело, имеющее более высокую аффинность к антигену MCT1, сначала связывается с поверхностью, содержащей MCT1, поскольку ожидается, что уменьшение связывания, наблюдаемое для второго антитела (при условии, что антитела конкурируют), будет иметь более высокую величину. Дополнительные примеры таких анализов приведены, например, в Saunal and Regenmortel, J. *Immunol. Methods* , 183:33-41 (1995), раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки.

[283] Кроме того, может ли антитело связываться с тем же самым или перекрывающимся эпитопом (перекрывающимимся эпитопами) на MCT1, что и другое антитело, или эпитоп, связанный с тестируемым антителом, в частности, может быть определено с использованием анализа на основе вестерн-блоттинга. В указанном анализе получают библиотеку пептидов, соответствующих антигену, связанному антителом, белку MCT1, который содержит перекрывающиеся участки белка, в типичном случае длиной 10-25, 10-20 или 10-15 аминокислот. Указанные различные перекрывающиеся аминокислотные пептиды, охватывающие последовательность MCT1, синтезируются и ковалентно связываются с нитроцеллюлозной мембраной PEPSPOTS™ (JPT Peptide Technologies, Берлин, Германия). Затем блоты готовят и исследуют в соответствии с рекомендациями производителя.

[284] По существу, иммуноблот-анализ затем обнаруживает флуорометрическими средствами, какие пептиды в библиотеке связываются с тестируемым антителом и, таким образом, может идентифицировать, какие остатки на антигене, т.е., MCT1, взаимодействуют с тестируемым антителом. (см. патент США № 7935340, включенный в данный документ посредством ссылки).

[285] В данной области техники известны различные методики картирования эпитопов. В качестве примера, все из рентгеновской сокристаллографии антигена и антитела; ЯМР; SPR (например, при 25 °C или 37 °C); олигопептидного сканирования на основе массива (или «анализ Pepscan»); сайт-направленного мутагенеза (например, сканирование аланином); картирования мутагенеза; водородно-дейтериевого обмена; фагового дисплея; и ограниченного протеолиза представляют собой методики картирования эпитопов, которые хорошо известны в данной области техники (см., например, Epitope Mapping Protocols: Second Edition, Methods in Molecular Biology, editors Mike Schutkowski and Ulrich Reineke, 2nd Ed., New York, NY: Humana Press (2009), и Epitope Mapping Protocols, *Methods in Molecular Biology*, editor Glenn Morris, 1st Ed., New York, NY: Humana Press (1996), оба из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

[286] Идентификацию одного или нескольких антител, которые связываются по сути или фактически тем же самым эпитопом, что и моноклональные антитела, описанные в данном документе, например, Ат1 к МСТ1 или его вариант, можно легко определить с использованием любого из множества иммунологических скрининговых анализов, в которых конкуренция антител может быть оценена. Ряд таких анализов обычно практикуется и хорошо известен в данной области техники (см., например, патент США № 5660827, выданный 26 августа 1997 г., который включен в данное описание посредством ссылки). Понятно, что определение эпитопа, с которым связывается антитело, описанное в данном документе, никоим образом не требуется для идентификации антитела, которое связывается с тем же самым или по сути тем же эпитопом, что и моноклональное антитело, описанное в данном документе.

[287] Например, если исследуемые тестируемые антитела получены от разных исходных животных или даже имеют другой изотип Ig, можно использовать простой конкурентный анализ, в котором контрольное антитело (например, Ат1 к МСТ1 или любое из Ат1-Ат95 или например, фрагмент или вариант любого из вышеизложенных антител смешивают с тестируемым антителом и затем наносят на образец, содержащий МСТ1, который, как известно, связывается с Ат1 к МСТ1 и с любым из Ат1-Ат95. Протоколы, основанные на ИФА, радиоиммуноанализах, вестерн-блоттинге и анализе BIACORE® (GE Healthcare Life Sciences, Марлборо,

Массачусетс) (как описано в разделе Примеры в данном документе), являются подходящими для использования в таких простых конкурентных исследованиях.

[288] В некоторых вариантах осуществления способ включает предварительное смешивание контрольного антитела с варьирующими количествами тестируемого антитела (например, в соотношениях около 1:1, 1:2, 1:10 или около 1:100) в течение периода времени до применения к образцу антигена МСТ1. В других вариантах осуществления контрольное и варьирующее количества тестируемого антитела можно добавлять отдельно и смешивать во время воздействия образца антигена МСТ1. При условии, что связанные антитела можно отличить от свободных антител (например, с помощью методик разделения или промывания для удаления несвязанных антител), а контрольное антитело от тестируемого антитела (например, с помощью видоспецифичных или изотип-специфических вторичных антител или путем специфической маркировки контрольного антитело детектируемой меткой), способ может быть использован для определения того, снижает ли тестируемое антитело связывание контрольного антитела с антигеном МСТ1, указывая на то, что тестируемое антитело распознает по сути тот же самый эпитоп, что и контрольное антитело (например, Ат1 к МСТ1 или любое из Ат1-Ат95). Связывание (меченого) контрольного антитела в присутствии полностью нерелевантного антитела (которое не связывает МСТ1) может выступать в качестве контрольного высокого значения. Низкое контрольное значение может быть получено путем инкубации меченого контрольного антитела с тем же самым, но немеченым контрольным антителом, при этом может возникнуть конкуренция и уменьшиться связывание меченого антитела. В тестовом анализе значительное снижение реактивности меченого антитела в присутствии тестируемого антитела указывает на тестируемое антитело, которое распознает по сути тот же самый эпитоп, т.е. эпитоп, который конкурирует с меченым контрольным антителом. Например, любое тестируемое антитело, которое уменьшает связывание Ат1 к МСТ1 с МСТ1, по меньшей мере, на около 50%, например, по меньшей мере, на около 60% или более, например, по меньшей мере, на около 70% (например, около 65-100%), при любом соотношении контрольное Ат1 к МСТ1:тестируемое антитело от примерно 1:1 или 1:10 до примерно 1:100 считается антителом, которое связывается по сути с тем же самым эпитопом или детерминантой, что и Ат1 к МСТ1 или любое из Ат1-Ат95. Предпочтительно, чтобы такое тестируемое антитело уменьшало связывание Ат1 к МСТ1 с МСТ1, например, по меньшей мере, на около 50%, по меньшей мере, на около 60%, по меньшей мере, на около

80% или, по меньшей мере, на около 90% (например, на около 95%) от связывания Ат1 к МСТ1, наблюдаемого в отсутствие тестируемого антитела. Указанные способы могут быть адаптированы для идентификации и/или оценки антител, которые конкурируют с другими контрольными антителами.

[289] Можно также предпочтительно использовать простой конкурентный анализ, в котором тестируемое антитело наносят в насыщающей концентрации на поверхность, на которой иммобилизован МСТ1. Поверхность в простом конкурентном анализе представляет собой, например, среду, подходящую для ОСТЕТ® и/или PROTEON®. Измеряют связывание контрольного антитела (например, Ат1 к МСТ1 или любого из Ат2-Ат95) с поверхностью, покрытой МСТ1. Указанное связывание с МСТ1-содержащей поверхностью только контрольного антитела сравнивают со связыванием контрольного антитела в присутствии тестируемого антитела. Значительное снижение связывания с поверхностью, содержащей МСТ1, контрольным антителом в присутствии тестируемого антитела указывает на то, что тестируемое антитело распознает по сути тот же самый эпитоп, что и контрольное антитело, так что тестируемое антитело «конкурирует» с контрольным антителом. Любое тестируемое антитело, которое снижает связывание контрольного антитела (такого как Ат1 к МСТ1) с МСТ1, по меньшей мере, на около 20% или более, по меньшей мере, на около 40%, по меньшей мере, на около 50%, по меньшей мере, на около 70% или более, можно считать антителом, которое связывается по сути с тем же самым эпитопом или детерминантой, что и контрольное антитело (например, Ат1 к МСТ1). Предпочтительно, чтобы такое тестируемое антитело уменьшало связывание контрольного антитела (например, Ат1 к МСТ1) с антигеном МСТ1, по меньшей мере, на около 50% (например, по меньшей мере, на около 60%, по меньшей мере, на около 70% или более). Понятно, что порядок контрольных и тестируемых антител может быть обратным; т.е., контрольное антитело может быть сначала связано с поверхностью, а затем после этого в конкурентном анализе тестируемое антитело приводится в контакт с поверхностью. Предпочтительно, антитело, имеющее более высокую аффинность к МСТ1, сначала связывается с поверхностью, содержащей МСТ1, поскольку ожидается, что уменьшение связывания, наблюдаемое для второго антитела (при условии, что антитела конкурируют), будет иметь более высокую величину. Дополнительные примеры таких анализов приведены, например, в Saunal and Regenmortel, *J. Immunol.*

Methods, 183:33-41 (1989), раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки.

[290] Определение того, связывается ли антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или производное антитела в одной из областей эпитопа, определенных выше, может быть выполнено способами, известными специалисту в данной области техники. В другом примере таких способов картирования/характеристики область эпитопа для анти-MCT1 антитела может быть определена путем «отпечатка» эпитопа с использованием химической модификации экспонированных аминов/карбоксилов в белке MCT1. Одним конкретным примером такой методики отпечатка является использование водородно-дейтериевого обмена, определяемого с помощью масс-спектрометрии («HXMS»), в котором происходит обмен водород/дейтерий протонов амида белка рецептора и лиганда, связывание и обратный обмен, при этом амидные группы остова, участвующие в связывании белка, защищены от обратного обмена и, следовательно, останутся дейтерированными. Соответствующие области могут быть идентифицированы на указанном этапе с помощью пептического протеолиза, высокопроизводительного жидкостного хроматографического разделения на микроколонке и/или масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (см., например, Ehring H., *Analytical Biochemistry*, 267(2):252-259 (1999)) и Engen, J. R. & Smith, D. L., *Anal. Chem.*, 73:256A-265A (2001)). Другим примером подходящей методики идентификации эпитопов является картирование эпитопов с помощью ядерного магнитного резонанса («ЯМР»), при котором в типичном случае сравнивается положение сигналов в двумерных ЯМР-спектрах свободного антигена и антигена, находящегося в комплексе с антигенсвязывающим пептидом, таким как антитело. Антиген обычно селективно изотопно мечен ^{15}N таким образом, что в ЯМР-спектре видны только сигналы, соответствующие антигену, и никаких сигналов от антигенсвязывающего пептида. Сигналы антигена, происходящие от аминокислот, участвующих во взаимодействии с антигенсвязывающим пептидом, в типичном случае будут сдвигать положение в спектрах комплекса по сравнению со спектрами свободного антигена, и аминокислоты, участвующие в связывании, могут быть идентифицированы таким путем. См., например, Ernst Schering *Res. Found. Workshop*, (44): 149-67 (2004); Huang et al, *J. Mol. Biol*, 281(l):61-67 (1998); и Saito and Patterson, *Methods*, 9(3):516-24 (1996). Картирование/характеризация эпитопа также может быть выполнена с использованием способов масс-спектрометрии

(«MS») (см., например, Downard, *J. Mass Spectrom.* , 35(4):493-503 (2000), и Kiselar and Downard, *Anal. Chem.*, 71(9): 1792-801 (1999)).

[291] Методики переваривания протеазами также могут быть пригодными в контексте картирования и идентификации эпитопов. Соответствующие области/последовательности антигенных детерминант могут быть определены путем расщепления протеазами, например, путем использования трипсина в соотношении около 1:50 в отношении переваривания MCT1 в течение ночи («o/n») при 37 °C и pH 7-8 с последующей масс-спектрометрическим («MS») анализом для идентификации пептидов. Пептиды, защищенные от расщепления трипсином с помощью анти-MCT1 антитела, могут впоследствии быть идентифицированы путем сравнения образцов, подвергнутых перевариванию трипсином, и образцов, инкубированных с антителом, а затем подвергнутых перевариванию, например, трипсином (таким образом, обнаруживается отпечаток для антитела). Другие ферменты, такие как химотрипсин или пепсин, могут быть использованы в сходных способах определения характеристик эпитопов. Кроме того, ферментативное переваривание может обеспечить быстрый способ анализа того, находится ли последовательность потенциальной антигенной детерминантны в области MCT1 в контексте MCT1-связывающего полипептида. Если полипептид не подвергается поверхностному воздействию, он, скорее всего, не имеет отношения к иммуногенности/антигенности (см., например, Manca, *Ann. 1st. Super. Sanita.*, 27(1):15-9 (1991) в отношении обсуждения аналогичных методик).

[292] Сайт-направленный мутагенез представляет собой еще одну методику, пригодную для характеристики связывания эпитопа. Например, при сайт-направленном мутагенезе со «сканированием аланином» (также известном, например, как сканирование аланином, мутагенез со сканированием аланином, мутации сканирования аланином, комбинаторное сканирование аланином или создание точечных мутаций аланина) каждый остаток в сегменте белка замещен остатком аланина (или другим остатком, таким как валин, при этом аланин присутствует в последовательности дикого типа) с помощью таких методологий, как, например, прямой синтез пептида или белка, сайт-направленный мутагенез, GENEART™ Mutagenesis Service (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) или мутагенез методом дробовика. Таким образом, с помощью указанной методики генерируется ряд точечных мутантов молекулы; количество генерируемых мутантов эквивалентно количеству остатков в молекуле, каждый из

которых заменяется по одному за раз одним аланиновым остатком. Аланин, как правило, используется для замены нативных остатков (дикого типа) из-за его небольшой, химически инертной, метильной функциональной группы, которая может имитировать предпочтения вторичной структуры, которыми могут обладать многие другие аминокислоты. Впоследствии эффекты замены нативного остатка аланином на аффинность связывания мутанта при сканировании аланином и его партнера по связыванию могут быть измерены с использованием таких способов, как, но не ограничиваясь ими, эксперименты по связыванию SPR. Если мутация приводит к значительному снижению аффинности связывания, наиболее вероятно, что мутированный остаток участвует в связывании. Моноклональные антитела, специфичные для структурных эпитопов (т.е., антитела, которые не связывают не подвергнутный фолдингу белок), можно использовать в качестве положительного контроля для экспериментов по аффинности связывания, чтобы проверить, что замена аланина не влияет на общую третичную структуру белка (поскольку изменения в общем фолдинге белка могут косвенно влиять на связывание и тем самым давать ложноположительный результат). См., например, Clackson and Wells, *Science*, 267:383-386 (1995); Weiss et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 97(16):8950-8954 (2000); и Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 1-6 (1996).

[293] Электронная микроскопия также может быть использована для выполнения «отпечатков» эпитопов. Например, Wang et al., Nature, 355:275-278 (1992) использовали скоординированное применение криоэлектронной микроскопии, трехмерной реконструкции изображения и рентгеновской кристаллографии для определения физического отпечатка Fab-фрагмента на поверхности капсида нативного вируса мозаики коровьего гороха.

[294] Другие формы анализа «без меток» для оценки эпитопов включают в себя SPR (продается коммерчески как система BIACORE®, GE Healthcare Life Sciences, Марлборо, Массачусетс) и рефлектометрическую интерференционную спектроскопию («RifS») (см., например, Fagerstam et al, *Journal of Molecular Recognition* , 3:208-14 (1990); Nice et al., *J. Chromatogr* ., 646:159-168 (1993); Leipert et al., Angew. *Chem. Int. Ed.*, 37:3308-3311 (1998); Kroger et al, *Biosensors and Bioelectronics*, 17:937-944 (2002)).

[295] В некоторых вариантах осуществления анти-MCT1 антитело по данному изобретению может иметь ту же самую или аналогичную структуру с другим анти-MCT1 антителом. В предпочтительном варианте осуществления анти-MCT1

антитело по данному изобретению имеет структуру, аналогичную структуре Ат1 к МСТ1 или любому из Ат1-Ат95. Структурное сходство может быть оценено посредством структурного выравнивания трехмерных белковых структур, полученного с помощью рентгеновской кристаллографии, ЯМР или других известных способов. Аналогичная структура может быть определена путем анализа различий в положениях между С-альфа-углеродом в CDR двух сравниваемых белков. Как правило, среднее значение RMSD, составляющее менее чем 5 Å, менее чем 4 Å, менее чем 3 Å, менее чем 2 Å, менее чем 1 Å или менее чем 0,5 Å в одной или нескольких CDR свидетельствует об аналогичной структуре белка. Таким образом, в одном варианте осуществления анти-МСТ1 антитело по данному изобретению имеет CDR, которые принимают ту же самую структуру, что и структуры Ат1 к МСТ1, со средним значением RMSD, составляющим менее 0,5 Å в структурном выравнивании.

[296] В другом варианте осуществления анти-МСТ1 антитело по данному изобретению может быть аналогичным с Ат1 к МСТ1 по физико-химическим свойствам поверхности белка. В конкретном варианте осуществления антитело имеет тот же самый поверхностный заряд, что и Ат1 к МСТ1 или поверхностный заряд любого из Ат1-Ат95 в связывающей поверхности антитела. В другом варианте осуществления оно имеет тот же же электростатический потенциал и/или гидрофобность.

Иллюстративные анти-МСТ1 антитела, фрагменты антител и слитые белки

[297] В одном варианте осуществления антитело по данному изобретению содержит CDR тяжелой цепи и легкой цепи Ат1 к МСТ1. В одном варианте осуществления антитело по данному изобретению содержит CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 4, 5, 6 и CDR легкой цепи SEQ ID NO: 7, 8, 9.

[298] В одном варианте осуществления антитело или фрагмент антитела по данному изобретению содержит домен V_H и домен V_L Ат1 к МСТ1 или любой домен Ат2-Ат95. В одном варианте осуществления антитело или фрагмент антитела по данному изобретению содержит домен V_H, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100 % идентичности по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или по отношению к домену V_H любого из Ат2-Ат95. В одном варианте осуществления

антитело или фрагмент антитела по данному изобретению содержит домен V_L, содержащий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100 % идентичности по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 или домену V_L любого из Ат1-Ат95. В одном варианте осуществления антитело или фрагмент антитела по данному изобретению содержит домен V_H, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100 % идентичности по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и домен V_L, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

[299] В одном варианте осуществления антитело или фрагмент антитела по данному изобретению содержит домен V_H, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100 % идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена V_H любого из Ат2-Ат95, и домен V_L, имеющей, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью домена V_L Ат1-Ат95, предпочтительно, при этом указанные гомологичные домены V_H и V_L соответствуют доменам того же самого антитела, т.е., одного из Ат2-Ат95.

[300] В одном варианте осуществления слитый белок по данному изобретению содержит CDR3 тяжелой цепи Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 6) или его вариант. В одном варианте осуществления слитый белок содержит пептид, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6. В частности, поскольку CDR3 тяжелой цепи Ат1 к MCT1 длиннее большинства CDR и явно выходит за плоскость антигенсвязывающей поверхности на Ат1 к MCT1, предполагается, что слитый белок, содержащий пептид с указанной последовательностью (SEQ ID NO: 6) или его вариант, может сохранить одну или несколько функций или возможностей связывания Ат1 к MCT1.

Дополнительные модификации

Конъюгаты антител

[301] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении описаны конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), состоящие из антитела (или фрагмента антитела, такого как одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), связанный с полезной нагрузкой лекарственным средством (часто цитотоксическим). Антитело вызывает связывание ADC с целевыми раковыми клетками. Часто ADC затем интернализируется клеткой, и лекарственное средство высвобождается в клетку. В результате целенаправленного воздействия побочные эффекты являются более низкими и обеспечивается более широкое терапевтическое окно. Гидрофильные линкеры (например, PEG4Mal) способствуют предупреждению выкачивания лекарственного средства из резистентных раковых клеток посредством транспортеров MDR (множественной лекарственной устойчивости).

[302] В другом аспекте в данном изобретении описаны иммуноконъюгаты, содержащие анти-MCT1 антитело или его фрагмент, конъюгированный с терапевтическим агентом, таким как цитотоксин, лекарственное средство (например, иммунодепрессант) или радиотоксин. Такие конъюгаты упоминаются в данном документе как «иммуноконъюгаты». Иммуноконъюгаты, которые включают в себя один или несколько цитотоксинов, называются «иммунотоксинами». Цитотоксин или цитотоксический агент включает в себя любой агент, который наносит вред (например, уничтожает) клеткам. Примеры включают в себя таксол, цитохалазин B, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенипозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин и их аналоги или гомологи. Терапевтические агенты также включают в себя, например, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил декарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлоретамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (BSNU), циклофосфамид, бусульфан, диброманнитол, стрептозотоцин, митомицин C и цис-дихлордиамин платину (II) (DDP), цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (ранее дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин),

блеомицин, митрамицин и антрамицин (AMC)), и антимитотические агенты (например, винкристин и винбластин).

[303] Другие примеры терапевтических цитотоксинов, которые могут быть конъюгированы с антителом, по меньшей мере, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, включают в себя дуокармицины, калихеамицин, майтанзины и ауристатины и их производные. Пример конъюгата с калихеамициновым антителом является коммерчески доступным (Mylotarg™ Wyeth).

[304] Цитотоксины могут быть конъюгированы с антителами, в соответствии, по меньшей мере, с некоторым вариантам осуществления данного изобретения с использованием линкерной технологии, доступной в данной области техники. Примеры типов линкеров, которые были использованы для конъюгирования цитотоксина с антителом, включают в себя, но не ограничиваются ими, гидразоны, тиоэфиры, сложные эфиры, дисульфиды и пептидсодержащие линкеры. Может быть выбран линкер, который, например, подвержен расщеплению при низком значении pH в лизосомальном компартменте или подвержен расщеплению протеазами, такими как протеазы, преимущественно экспрессируемые в опухолевой ткани, такие как катепсины (например, катепсины B, C, D). Для дальнейшего обсуждения типов цитотоксинов, линкеров и способов конъюгирования терапевтических агентов с антителами см. также Saito, G. et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev*. 55: 199-215; Trail, P. A. et al. (2003) *Cancer Immunol. Immunother*. 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T. M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3: 1089-1091; Senter, P. D. and Springer, C. J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

[305] Антитела по данному изобретению также могут быть конъюгированы с радиоактивным изотопом для получения цитотоксических радиофармацевтических препаратов, также называемых радиоиммуноконъюгатами. Примеры радиоактивных изотопов, которые могут быть конъюгированы с антителами для диагностического или терапевтического использования, включают, но не ограничиваются ими, йод 131, индий 111, иттрий 90 и лютеций 177. Способы получения радиоиммуноконъюгатов определены в данной области техники. Радиоиммуноконъюгаты являются коммерчески доступными, в том числе Zevalin® (BiogenIDEC) и Bexxar® (Corixa

Pharmaceuticals), и аналогичные способы могут быть использованы для получения радиоиммуноконъюгатов с использованием антител в соответствии, по меньшей мере, с некоторым вариантам осуществления данного изобретения.

[306] Анти-MCT1 антитела и конъюгаты в соответствии, по меньшей мере, с некоторым вариантам осуществления данного изобретения, можно использовать для модификации определенного биологического ответа, а фрагмент лекарственного средства не следует истолковывать как ограниченный классическими химическими терапевтическими агентами. Например, фрагмент лекарственного средства может представлять собой белок или полипептид, обладающий необходимой биологической активностью. Такие белки могут включать в себя, например, ферментативно активный токсин или его активный фрагмент, такой как абрин, рицин А, экзотоксин Pseudomonas или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухоли или интерферон-γ; или модификаторы биологического ответа, такие как, например, лимфокины, интерлейкин-1 («IL-1»), интерлейкин-2 («IL-2»), интерлейкин-6 («IL-6»), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор («GM-CSF»), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор («G-CSF») или другие факторы роста.

[307] Способы конъюгирования такого терапевтического фрагмента с антителами хорошо известны, см., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications,* Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), и Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

Модификации константных областей, Fc-домена и посттрансляционных модификаций

[308] В качестве дополнения или в качестве альтернативы модификациям, выполненным в каркасных областях или областях CDR, антитела в соответствии,

по меньшей мере, с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения могут быть сконструированы так, чтобы включать модификации в пределах Fc-области, в типичном случае для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как период полужизн в сыворотке крови, фиксация комплемента, связывание с Fc-рецептором и/или антиген-зависимая клеточная цитотоксичность. Кроме того, антитело в соответствии, по меньшей мере, с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения может быть химически модифицировано (например, один или несколько химических фрагментов могут быть присоединены к антителу) или модифицировано так, чтобы изменить его гликозилирование, в этом случае также для того, чтобы изменить одно или несколько функциональных свойств антитела. Такие варианты осуществления описаны ниже. Нумерация остатков в Fc-области соответствует индексу ЕС в соответствии с Кабат.

[309] В одном варианте осуществления шарнирная область CH1 является модифицированной таким образом, что количество остатков цистеина в шарнирной области изменяется, например, увеличивается или уменьшается. Указанный подход описан далее в патенте США № 5677425 в авторстве Bodmer et al. Количество остатков цистеина в шарнирной области CH1 изменяется, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для увеличения или уменьшения стабильности антитела.

[310] В другом варианте осуществления шарнирную Fc-область антитела мутируют для уменьшения биологического периода полужизни антитела. Более конкретно, одну или несколько мутаций аминокислот вводят в область интерфейса CH2-CH3-домена фрагмента Fc-шарнира таким образом, что антитело имеет нарушенное связывание стафилококкового белка А (SpA) по сравнению со связыванием нативного домена Fc-шарнира SpA. Указанный подход более подробно описан в патенте США № 6165745 в авторстве Ward et al.

[311] В другом варианте осуществления антитело является модифицированным для увеличения его биологического периода полужизни. Возможны разные подходы. Например, может быть введена одна или несколько из следующих мутаций: T252L, T254S и T256F, как описано в патенте США № 6277375 в авторстве Ward. В качестве альтернативы, чтобы увеличить биологический период полужизни, антитело может быть изменено в CH1- или CL-области таким образом, чтобы оно содержало эпитоп связывания рецептора реутилизации,

извлеченный из двух петель CH2-домена Fc-области IgG, как описано в патентах США №№ 5869046 и 6121022 в авторстве Presta et al.

[312] В еще одних вариантах осуществления Fc-область изменяется путем замены, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком для изменения эффекторных функций антитела. Например, одна или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, могут быть заменены другим аминокислотным остатком таким образом, чтобы антитело изменяло аффинность по отношению к эффекторному лиганду, но сохраняло антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, в отношении которого изменяется аффинность, может представлять собой, например, Fc-рецептор или компонент C1 комплемента. Указанный подход более подробно описан в патентах США №№ 5624821 и 5648260 в авторстве Winter et al.

[313] В некоторых вариантах осуществления одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322, можно заменить другим аминокислотным остатком таким образом, чтобы антитело изменяло связывание C1q и/или снижало или устраняло комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). Указанный подход более подробно описан в патенте США № 6194551 в авторстве Idusogie et al.

[314] В другом варианте осуществления один или несколько аминокислотных остатков в аминокислотных положениях 231 и 239 изменены таким образом, чтобы тем самым изменить способность антитела фиксировать комплемент. Указанный подход описан дополнительно в публикации PCT WO 94/29351 в авторстве Bodmer et al.

[315] В еще одном варианте осуществления Fc-область модифицируют для увеличения аффинности антитела к Fγ-рецептору путем модификации одной или нескольких аминокислот в следующих положениях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258. 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309 , 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439. Указанный подход описан дополнительно в публикации PCT WO 00/42072 в авторстве Presta. Кроме того, сайты связывания на человеческом IgG1 для FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn были картированы, и были описаны варианты с улучшенным связыванием (*см.* Shields,

RL et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Показано, что специфические мутации в положениях 256, 290, 298, 333, 334 и 339 улучшают связывание с FcγRIII. Кроме того, показано, что следующие комбинированные мутанты улучшают связывание FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A и S298A/E333A/K334A. Кроме того, такие мутации, как M252Y/S254T/T256E или M428L/N434S, улучшают связывание с FcRn и увеличивают период полужизни антител в кровотоке (см. Chan CA и Carter PJ (2010) *Nature Rev Immunol* 10:301-316).

[316] В еще одном варианте осуществления антитело может быть модифицировано для устранения обмена *in vivo* Fab-фрагментов. В частности, этот процесс включает в себя обмен половинных молекул IgG4 (одна тяжелая цепь плюс одна легкая цепь) между другими антителами IgG4, что эффективно приводит к образованию биспецифических антител, которые являются функционально моновалентными. Мутации в шарнирной области и константных доменах тяжелой цепи могут устранять указанный обмен (см. Aalberse, RC, Schuurman J., 2002, *Immunology* 105:9-19).

[317] В еще одном варианте осуществления гликозилирование антитела является модифицированным. Например, можно получать агликозилированное антитело (т.е., антитело, в котором отсутствует гликозилирование). Гликозилирование может быть измененным, например, для повышения аффинности антитела в отношении антигена. Такие углеводные модификации можно осуществлять, например, путем изменения одного или нескольких сайтов гликозилирования в пределах последовательности антитела. Например, можно сделать одну или несколько аминокислотных замен, которые приводят к исключению одного или нескольких сайтов гликозилирования каркасной вариабельной области, чтобы тем самым исключить гликозилирование в данном сайте. Такое агликозилирование может повышать аффинность антитела по отношению к антигену. Такой подход более подробно описан в патентах США №№ 5714350 и 6350861 в авторстве Co et al.

[318] В качестве дополнения или в качестве альтернативы, можно получить антитело, которое характеризуется измененным типом гликозилирования, как, например, гипофукозилированное антитело со сниженным количеством фукозильных остатков или антитело с повышенным содержанием структур с GlcNac в точках ветвления. Было продемонстрировано, что такие измененные

паттерны гликозилирования повышают способность антител к ADCC. Такие углеводные модификации можно осуществлять, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Клетки с измененным механизмом гликозилирования был описаны в уровне техники, и их можно применять в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируют рекомбинантные антитела, в соответствии, по меньшей мере, с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения с получением, таким образом, антитела с измененным гликозилированием. Например, в клеточных линиях Ms704, Ms705 и Ms709 отсутствует ген фукозилтрансферазы, FUT8 (а (1,6) фукозилтрансфераза) таким образом, что в антителах, экспрессируемых в клеточных линиях Ms704, Ms705 и Ms709, отсутствует фукоза на их углеводах. Клеточные линии FUT8 Ms704, Ms705 и Ms709 создаются путем целенаправленного разрушения гена FUT8 в клетках CHO/DG44 с использованием двух замещающих векторов (*см.* публикацию патента США № 20040110704 в авторстве Yamane et al. и Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). В качестве другого примера, в EP 1176195 в авторсвте Hanai et al. описывается клеточная линия с функционально нарушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу таким образом, что антитела, экспрессируемые в такой клеточной линии, проявляют гипофукозилирование путем уменьшения или устранения фермента, связанного с 1,6-связью. Hanai et al. также описывают клеточные линии, которые имеют низкую ферментативную активность для добавления фукозы к N-ацетилглюкозамину, который связывается с Fc-областью антитела или не обладает ферментативной активностью, например, клеточная линия миеломы крысы YB2/0 (№ в ATCC CRL 1662). В публикация PCT WO 03/035835 в авторстве Presta описывается вариант клеточной линии CHO, клетки Lecl3, со сниженной способностью присоединять фукозу к с Asn(297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине (см. также Shields, R. L. et al. (2002) *Biol. Chem.* 277:26733-26740). В публикации PCT WO 99/54342 в авторстве Umana et al. описываются клеточные линии, сконструированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, P(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), так что антитела, экспрессируемые в сконструированных клеточных линиях, демонстрируют повышенное содержание структур с GlcNac в точках ветвления, что приводит к увеличению активности ADCC антител (см. также

Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). В качестве альтернативы остатки фукозы антитела могут быть отщеплены с использованием фермента фукозидазы. Например, фукозидаза L-фукозидаза удаляет фукозильные остатки из антител (Tarentino, AL et al. (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

[319] Другой модификацией антител в данном документе, которая предусмотрена данным изобретением, является пегилирование или добавление других водорастворимых фрагментов, в типичном случае полимеров, например, для увеличения периода полужизни. Антитело может быть пегилировано, например, для увеличения биологического (например, сывороточного) периода полужизни антитела. Чтобы пегилировать антитело, антитело или его фрагмент обычно подвергают взаимодействию с полиэтиленгликолем (ПЭГ), таким как реакционноспособное эфирное или альдегидное производное ПЭГ, в условиях, в которых одна или несколько групп ПЭГ присоединяются к антителу или фрагменту антитела. Предпочтительно пегилирование проводят с помощью реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой ПЭГ (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). Используемый в данном документе термин «полиэтиленгликоль» предназначен для охвата любой из форм ПЭГ, которые были использованы для дериватизации других белков, таких как моно (Ci-Cio) алкокси- или арилокси-полиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеимид. В определенных вариантах осуществления антитело, подлежащее пегилированию, представляет собой агликозилированное антитело. Способы пегилирования белков известны в данной области техники и могут быть применены к антителам в соответствии, по меньшей мере, с некоторым вариантам осуществления данного изобретения. *См.,* например, EP 0154316 в авторстве Nishimura et al. и EP 0401384 в авторстве Ishikawa et al.

Молекулы нуклеиновых кислот

[320] В данном изобретении дополнительно представлены нуклеиновые кислоты, которые кодируют анти-MCT1 антитело по данному изобретению, или его фрагмент или конъюгат. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в лизате клеток или в частично очищенной или в по сути чистой форме. Нуклеиновая кислота является «выделенной» или оказывается по сути чистой при очищении от других компонентов клетки или других нежелательных примесей, например, других нуклеиновых кислот или белков клетки, с помощью стандартных методик, в том числе обработки щелочным SDS, CsCl-бэндинга, колоночной

хроматографии, электрофореза в агарозном геле и других методик, хорошо известных из уровня техники. См. Ausubel, et al. (2011) *Current Protocols in Molecular Biology,* John Wiley & Sons, Inc. Нуклеиновая кислота в соответствии, по меньшей мере, с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения может представлять собой, например, ДНК или РНК и может содержать или не содержать интронные последовательности. В предпочтительном варианте осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК.

[321] Нуклеиновые кислоты в соответствии, по меньшей мере, с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения могут быть получены с использованием стандартных методик молекулярной биологии. Для антител, экспрессируемых гибридомами (например, гибридомами, полученными от трансгенных мышей, несущих гены иммуноглобулина человека, как описано дополнительно ниже), кДНК, кодирующие легкие и тяжелые цепи антитела, полученные с помощью гибридомы, можно получить стандартными методиками ПЦР-амплификации или клонирования кДНК. В случае антител, получаемых из библиотеки генов иммуноглобулинов (напр., с применением методик фагового дисплея), нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, можно выделить из библиотеки.

[322] После получения фрагментов ДНК, кодирующих сегменты V_H и V_L, указанные фрагменты ДНК можно подвергать дополнительным манипуляциям с помощью стандартных методик рекомбинантной ДНК, например, для превращения генов вариабельной области в гены полноразмерной цепи антитела, в гены Fab-фрагмента или в ген scFv. При этих манипуляциях фрагмент ДНК, кодирующий V_L или V_H, функционально связывают с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой белок, такой как константная область антитела или гибкий линкер. Ранее определенный термин «функционально связанный» означает, что два фрагмента ДНК соединены таким образом, что аминокислотные последовательности, кодируемые этими двумя фрагментами ДНК, остаются в пределах рамки считывания.

[323] Выделенную ДНК, кодирующую область V_H, можно преобразовывать в ген полноразмерной тяжелой цепи путем функционального связывания ДНК, кодирующей V_H, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи (CH1, CH2 и CH3). Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека известны в данной области техники (см., например, Kabat,

E.A, el al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, охватывающие указанные области, можно получить с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область IgG1, lgG2, lgG3, lgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, но наиболее часто, например, представляет собой константную область IgGI, lgG2 или lgG4. Для гена тяжелой цепи Fab-фрагмента ДНК, кодирующую V_H, можно функционально связать с другой молекулой ДНК, кодирующей только константную CH1-область тяжелой цепи.

[324] Выделенная ДНК, кодирующая область V_L, может быть преобразована в полноразмерный ген легкой цепи (а также ген легкой цепи Fab) путем функционального связывания ДНК, кодирующей V_L, с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи, CL. Последовательности генов константной области легкой цепи человека известны в данной области техники (см., например, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), а фрагменты ДНК, охватывающие указанные области, могут быть получены с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа (к) или лямбда (λ), но, в большинстве случаев, представляет собой константную область к.

[325] Для создания гена scFv фрагменты ДНК, кодирующие V_H и V_L, функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность (Gly4-Ser)3 таким образом, что последовательности V_H и V_L могут экспрессироваться в виде непрерывного одноцепочечного белка с областями V_L и V_H, соединенными гибким линкером (см., например, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) *Nature* 348:552-554).

Векторы

[326] В данном изобретении также представлены векторы, в которые встроена ДНК по данному изобретению. Векторы, полученные из ретровирусов, являются подходящими инструментами для достижения долговременного переноса генов, поскольку они обеспечивают генетическую стабильность и высокую экспрессию в дополнение к гибкому геному. Кроме того, клинический опыт применения

ретровирусных векторов представляет рекомендации по оптимизации эффективности и безопасности их применения.

[327] Вкратце, экспрессия природных или синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, в типичном случае достигается путем функционального связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или его участки, с промотором и включения конструкции в экспрессионный вектор. Векторы могут быть подходящими для репликации и интеграции у эукариот. Типичные клонирующие векторы содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы, пригодные для регуляции экспрессии необходимой последовательности нуклеиновой кислоты.

[328] Нуклеиновая кислота может быть клонирована во множество типов векторов. Например, нуклеиновая кислота может быть клонирована в вектор, включающий, но не ограничиваясь ими, плазмиду, фагмиду, производное фага, вирус животного происхождения и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают в себя экспрессионные векторы, репликационные векторы, векторы генерации зондов и секвенирующие векторы.

[329] Кроме того, экспрессионный вектор может быть представлен клетке в форме вирусного вектора. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области техники и описана, например, в Sambrook et al. (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), и в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые являются пригодными в качестве векторов, включают в себя, но не ограничиваясь ими, ретровирусы, гамма-ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. Как правило, подходящий вектор содержит точку начала репликации, функционирующую, по меньшей мере, в одном организме, промоторную последовательность, соответствующие сайты эндонуклеаз рестрикции и один или несколько селектируемых маркеров (например, WO 01/96584; WO 01/29058; и патент США № 6326193).

[330] Был разработан ряд вирусных систем для переноса генов в клетки млекопитающих. Например, ретровирусы представляют собой удобную платформу для систем доставки генов. Выбранный ген может быть вставлен в вектор и упакован в ретровирусные частицы с использованием методик, известных в данной области техники. Затем рекомбинантный вирус может быть

выделен и доставлен в клетки субъекта либо *in vivo,* либо *ex vivo*. Ряд ретровирусных систем известен в данной области техники. В некоторых вариантах используются аденовирусные векторы. Ряд аденовирусных векторов известен в данной области техники. В одном варианте осуществления используются ретровирусные векторы.

[331] Дополнительные промоторные элементы, например энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они расположены в области на 30-110 п.н. выше от сайта начала последовательности, хотя недавно было показано, что ряд промоторов также содержат функциональные элементы ниже от сайта начала последовательности. Интервал между промоторными элементами часто является гибким, так что функция промотора сохраняется, когда элементы инвертированы или перемещены относительно друг друга. В промоторе тимидинкиназы (tk) расстояние между промоторными элементами может быть увеличено до 50 п.н., прежде чем активность начнет снижаться. В зависимости от промотора, по-видимому, отдельные элементы могут функционировать совместно или независимо для активации транскрипции.

[332] Могут быть использованы различные промоторные последовательности, в том числе, но не ограничиваясь ими, немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), промотор фактор элонгации 1α (EF-1α), ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор длинного концевого повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, немедленно-ранний промотор вируса Эпштейна-Барра, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы гена человека, такие как, но не ограничиваясь ими, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Кроме того, данное изобретение не должно быть ограничено использованием конститутивных промоторов. Индуцируемые промоторы также рассматриваются как часть данного изобретения. Использование индуцируемого промотора обеспечивает молекулярный переключатель, способный включать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, когда такая экспрессия предпочтительна, или отключать экспрессию, когда экспрессия не является предпочтительной. Примеры индуцируемых промоторов включают в себя, но не ограничиваясь ими, металлотионеиновый

промотор, глюкокортикоидный промотор, прогестероновый промотор и тетрациклиновый промотор.

[333] Чтобы оценить экспрессию антитела, антигенсвязывающего фрагмента антитела или его участка, экспрессионный вектор, который должен быть введен в клетку, также может содержать либо ген селектируемого маркера, либо репортерный ген, либо и то, и другое для облегчения идентификации и отбора экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые необходимо трансфицировать или инфицировать с помощью вирусных векторов. В других аспектах селектируемый маркер может быть нанесен на отдельный фрагмент ДНК и использован в процедуре котрансфекции. Как селектируемые маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках-хозяевах. Пригодные селектируемые маркеры включают в себя, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как neo и т.п.

[334] Репортерные гены используются для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. Как правило, репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует или не экспрессируется организмом или тканью реципиента и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется в некотором легко обнаруживаемом свойстве, например, ферментативной активности. Экспрессию репортерного гена анализируют в подходящее время после введения ДНК в клетки реципиента. Подходящие репортерные гены могут включать в себя гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, секретированную щелочную фосфатазу или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tei et al., 2000 *FEBS Letters* 479:79-82). Подходящие экспрессионные системы хорошо известны и могут быть получены с использованием известных методик или получены коммерчески. Как правило, конструкция с минимальной 5'-фланкирующей областью, показывающая самый высокий уровень экспрессии репортерного гена, идентифицируется как промотор. Такие промоторные области могут быть связаны с репортерным геном и использоваться для оценки агентов на способность модулировать управляемую промотором транскрипцию.

Трансдукция

[335] Способы введения и экспрессии генов в клетке известны в данной области техники. В контексте экспрессионного вектора вектор может быть легко введен в клетку-хозяина, например в клетку млекопитающего, бактерии, дрожжевого гриба или насекомого, любым способом в данной области техники. Например, экспрессионный вектор может быть перенесен в клетку-хозяина физическим, химическим или биологическим способом.

[336] Физические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают осаждение с использованием фосфата кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и т.п. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области техники. См., например, Sambrook et al. (2001, M*olecular Cloning: A Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Предпочтительным способом введения полинуклеотида в клетку-хозяина является трансфекция с использованием фосфата кальция.

[337] Биологические методы введения полинуклеотида, представляющего интерес, в клетку-хозяина включают в себя использование ДНК- и РНК-векторов. Вирусные векторы, и особенно ретровирусные векторы, стали наиболее широко используемым способом для вставки генов в млекопитающих, например, в клетки человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивирусов, поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т.п. *См.*, например, патенты №№ 5350674 и 5585362.

[338] Химические средства для введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают коллоидные дисперсионные системы, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, в том числе эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Иллюстративная коллоидная система для применения в качестве средства доставки *in vitro* и *in vivo* представляет собой липосому (например, везикулу с искусственной мембраной).

[339] В случае, когда используется невирусная система доставки, иллюстративным средством доставки является липосома. Предполагается применение липидных составов для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*). В другом аспекте нуклеиновая кислота может быть ассоциирована с липидом. Нуклеиновая кислота, ассоциированная с

липидом, может быть инкапсулирована в водной внутренней части липосомы, вкраплена в липидный бислой липосомы, присоединена к липосоме с помощью связывающей молекулы, которая ассоциирована как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, захваченным в липосому, образовывать комплекс с липосомой, диспергироваться в растворе, содержащем липид, смешиваться с липидом, объединяться с липидом, содержаться в виде суспензии в липиде, содержаться или образовывать комплекс с мицеллой или иным образом ассоциироваться с липидом. Композиции, связанные с липидом, липидом/ДНК или липидом/экспрессионным вектором, не ограничиваются какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут присутствовать в двухслойной структуре, в виде мицелл, или в «сжатой» структуре. Они также могут просто вкрапляться в раствор, возможно, образуя агрегаты, которые не являются однородными по размеру или форме. Липиды представляют собой жирные вещества, которые могут встречаться в природе или представлять собой синтетические липиды. Например, липиды включают в себя жировые капли, которые естественным образом встречаются в цитоплазме, а также класс соединений, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминоспирты и альдегиды.

[340] Липиды, пригодные для использования, могут быть получены из коммерческих источников. Например, димиристилфосфатидилхолин («DMPC») может быть получен от Sigma, Сент-Луис, Миссури; дицетилфосфат («DCP») может быть получен от K & K Laboratories (Плейнвью, Нью-Йорк); холестерин («Choi») может быть получен от Calbiochem-Behring; димиристилфосфатидилглицерин («DMPG») и другие липиды могут быть получены от Avanti Polar Lipids, Inc. (Бирмингем, Алабама). Исходные растворы липидов в хлороформе или смеси хлороформ/метанол могут храниться при температуре около -20 градусов Цельсия. Хлороформ используется в качестве единственного растворителя, поскольку он легче испаряется, чем метанол. «Липосома» представляет собой общий термин, охватывающий множество одно- и многослойных липидных носителей, образованных путем генерации замкнутых липидных бислоев или агрегатов. Липосомы могут быть охарактеризованы как имеющие везикулярные структуры с фосфолипидной двухслойной мембраной и внутренней водной средой. Многослойная липосома имеет множество липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются спонтанно, когда

фосфолипиды, суспендируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самоупорядочиванию перед образованием закрытых структур и задерживают воду и растворенные растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh et al., 1991 *Glycobiology* 5: 505-10). Однако композиции, которые имеют другие структуры в растворе, отличные от нормальная везикулярная структуры, также охватываются. Например, липиды могут иметь мицеллярную структуру или просто существовать в виде неоднородных агрегатов молекул липидов. Также рассматриваются комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота.

[341] Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина или иного воздействия на клетку ингибитора по данному изобретению, чтобы подтвердить присутствие последовательности рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине, могут быть выполнены различные анализы. Такие анализы включают в себя, например, «молекулярно-биологические» анализы, хорошо известные специалистам в данной области техники, такие как саузерн- и нозерн-блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; «биохимические» анализы, такие как обнаружение присутствия или отсутствия определенного пептида, например, иммунологическими средствами (ИФА и вестерн-блоттингом) или с помощью описанных в данном документе анализов для идентификации агентов, попадающих в объем данного изобретения.

Терапевтическое применение

[342] Выделенные анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, полученные вышеизложенными способами, или композиции, содержащие то же самое, можно использовать в качестве лекарственного препарата при лечении заболевания, нарушения или патологического состояния у субъекта. В некоторых вариантах осуществления такой лекарственный препарат можно использовать для лечения аутоиммунного, воспалительного или аллергического патологического состояния. В некоторых вариантах осуществления лекарственный препарат можно использовать для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления лекарственный препарат можно использовать для лечения EIHI.

Субъект

[343] Субъект, упомянутый в данном документе, может представлять собой любой живой субъект. В предпочтительном варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающего. Млекопитающее, упоминаемое в данном

документе, может представлять собой любое млекопитающее. Используемый в данном документе термин «млекопитающее» относится к любому млекопитающему, в том числе, но не ограничиваясь ими, млекопитающих отряда Rodentia, таких как мыши и хомяки, и млекопитающих отряда Logomorpha, таких как кролики. Млекопитающие могут принадлежать отряду Carnivora, в том числе Felines (кошки) и Canines (собаки). В другом аспекте млекопитающие относятся к отряду Artiodactyla, в том числе к Bovines (коровы) и к Swines (свиньи), или к отряду Perssodactyla, в том числе к Equines (лошади). Млекопитающие могут относиться к отряду Primates, Ceboids или Simoids (обезьяны), или к отряду Anthropoids (люди и человекообразные обезьяны).

[344] В некоторых вариантах осуществления субъект, которому вводят антитела, фрагменты антител или композиции, представляет собой примата, такого как человек. В некоторых вариантах осуществления примат представляет собой обезьяну или человекообразную обезьяну. Субъект может представлять собой мужчину или женщину и может быть любого подходящего возраста, в том числе субъектами младенческого, подросткового, молодого, взрослого и пожилого возраста. В некоторых примерах пациент или субъект представляет собой валидированную модель на животных для лечения заболевания, терапии антителами и/или для оценки токсических результатов.

[345] В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется постоянное или рецидивирующее заболевание, например, после лечения другой иммунотерапией и/или другой терапией, в том числе химиотерапией, облучением и/или трансплантацией гемопоэтическими стволовыми клетками (HSCT), например, аллогенной HSCT. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к эффективному лечению субъекта, несмотря на то, что субъект стал устойчивым к другой терапии. В некоторых вариантах осуществления у субъекта не было рецидива, но определено, что он подвержен риску рецидива, например, высокому риску рецидива, и, таким образом, соединение или композицию вводят профилактически, например, чтобы уменьшить вероятность или предотвратить рецидив.

[346] В некоторых вариантах осуществления способы включают введение анти-MCT1 антител, фрагментов антител или композиций, субъекту, в ткань или в клетку. Субъектом, подлежащим лечению, или у которого получена ткань или клетка, может быть субъект, у которого имеется риск заболевания или

патологического состояния, ассоциированного с экспрессией MCT1, с риском его или подозрением на него. В некоторых вариантах осуществления антитела, фрагменты антител или композиции вводят субъекту, имеющему конкретное заболевание или патологическое состояние, подлежащее лечению. В некоторых вариантах осуществления антитела, фрагменты антител или композиции вводят субъекту, такому как субъект, имеющий или подверженный риску заболевания или патологического состояния. В некоторых аспектах способы, таким образом, направлены на лечение, например, ослабление одного или нескольких симптомов заболевания или патологического состояния, таких как уменьшение доли активированных Т-клеток или В-клеток, опосредующих аутоиммунное нарушение.

Функциональная активность и/или оценка

[347] Ингибирование MCT1 может быть использовано для снижения аутоиммунных реакций. Снижение может быть представлено в форме ингибирования или блокирования уже имеющегося аутоиммунного ответа или может включать в себя предупреждение индукции аутоиммунного ответа. Функции активированных иммунных клеток можно ингибировать путем ингибирования MCT1-опосредованного транспорта лактата. Например, Ат1 к MCT1 может связываться с MCT1, который экспрессируется и является иммунологически релевантным на активированных Т-клетках и В-клетках, тем самым снижая аутоиммунный ответ, опосредованный указанными клетками. Как раскрыто в данном документе, другие анти-MCT1 антитела могут быть идентифицированы, например, по их способности ингибировать активность или пролиферацию активированных Т-клеток и/или на основе их иммуносупрессорного эффекта *in vitro* или в моделях воспалительных, аллергических или аутоиммунных заболеваний.

[348] Для определения, например, клеточной пролиферации или эффекторной функции (например, продуцирования антител, продукции цитокинов, фагоцитоза) в присутствии анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента можно использовать ряд признанных в данной области техники данных измерений об активации клеток. Способность тестируемого антитела ингибировать MCT1 можно легко определить путем измерения способности антитела влиять на снижение измеряемой пролиферации или эффекторной функции. Соответственно, способность тестируемого антитела быть иммуносупрессорным и блокировать аутоиммунную активацию может быть определена путем

измерения продуцирования и/или пролиферации цитокинов при различных концентрациях антигена. В некоторых вариантах осуществления продуцирование или секреция воспалительных цитокинов может использоваться для контроля эффективности способов лечения по данному изобретению.

[349] В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения антителами по данному изобретению может быть измерена путем обнаружения кетонов в моче. В частности, поскольку Ат1 к MCT1 не реагирует перекрестно с MCT1 грызунов, результаты *in vivo* в исследованиях на мышах могут свидетельствовать о том, что кетонурия может быть индуцирована непосредственно из лейкоцитов человека, поскольку они являются единственными целевыми клетками у мышей NSG. Кроме того, некоторые из наблюдаемых иммуномодулирующих эффектов ингибирования MCT1 могут быть косвенно обусловлены образованием кетонов, поскольку исследования показали, что повышенный уровень кетонов в крови может подавлять воспалительные процессы (**ссылка 67**).

[350] В некоторых аспектах эффективность лечения антителами по данному изобретению измеряют путем оценки клинического результата. Для лечения аутоиммунных, воспалительных или аллергических патологических состояний эффективность лечения может быть измерена по улучшению состояния. Например, уменьшение симптомов системной красной волчанки, повышение выживаемости при GVHD, уменьшение отторжения трансплантата, снижение концентрации аутоантител и т.д. В случае лечения рака это может включать в себя уменьшение опухолевой нагрузки или нагрузки, стабилизацию опухоли, выживаемость без прогрессирования, или общую выживаемость. В случае лечения EIHI такой клинический результат может включать снижение гипогликемии после физической активности.

Снижение иммунных реакций

[351] Ингибирование MCT1 можно использовать для снижения иммунных реакций. Снижение может быть представлено в форме ингибирования или блокирования уже имеющегося иммунного ответа или может включать в себя предупреждение индукции иммунного ответа. Функции активированных иммунных клеток могут быть ингибированы путем подавления иммунных клеточных ответов или индукции специфической анергии в иммунных клетках или обоих. Например, анти-MCT1 антитела могут связываться с MCT1 на активированных Т-клетках и тем самым снижать уровень иммунного ответа. Указанное антитело может быть

моноспецифическим или мультиспецифическим, например, оно может представлять собой биспецифическое антитело, такое как BiTE. Например, такое антитело может содержать антигенсвязывающий фрагмент MCT1 и другой антигенсвязывающий фрагмент, например, который целенаправленно воздействует на рецептор клеточной поверхности иммунной клетки, например, активированной Т-клетки или В-клетки. Такое антитело, помимо включения сайта связывания антигена MCT1, может содержать сайт связывания, который связывается с рецептором антигена В-клетки, рецептором антигена Т-клетки или Fc- или другим рецептором, чтобы нацелить молекулу на специфическую клеточную популяцию. Отбор этого второго антигена для биспецифического антитела обеспечивает гибкость в отборе клеточной популяции, на которую необходимо направить воздействие. Как раскрыто в данном документе, другие антитела, связывающие MCT1 человека, могут быть идентифицированы по их способности ингибировать активность или пролиферацию Т-клеток или В-клеток и/или на основе их иммуносупрессорных эффектов *in vitro* или на моделях воспалительных, аллергических или аутоиммунных заболеваний.

[352] Толерантность может быть индуцирована против специфических антигенов путем совместного введения антигена с анти-MCT1 антителом в соответствии с данным изобретением. Например, толерантность может быть индуцирована к конкретным полипептидам. Иммунные ответы на аллергены или чужеродные полипептиды, в отношении которых иммунный ответ является нежелательным, могут быть ингибированы. Например, пациенты, которые получают фактор VIII, часто генерируют антитела против указанного фактора свертывания крови. Совместное введение анти-MCT1 антитела по данному изобретению с рекомбинантным фактором VIII может подавлять этот нежелательный иммунный ответ.

[353] Анти-MCT1 антитело в соответствии с данным изобретением можно использовать в сочетании с другим агентом, который блокирует активность костимуляторных рецепторов на иммунной клетке или агонизирует активность иммуносупрессорного рецептора или лиганда, экспрессируемого на иммунных клетках, для подавления иммунных ответов. Иллюстративные молекулы включают в себя: агонисты PD-1, PDL-1, растворенные формы CTLA-4, анти-B7-1 антитела, анти-B7-2 антитела, антагонистические антитела, целенаправленно воздействующие на один или несколько из LAG-3, TIM-3, BTLA B7-H4, B7H3 и др.

и/или агонистические антитела, целенаправленно воздействующие на один или несколько из CD40, CD137, OX40, GITR, CD27, CD28, ICOS или VISTA или их комбинации. Указанные фрагменты могут быть объединены в одну композицию или соединение, например, биспецифическое антитело, содержащее анти-MCT1 антитело по данному изобретению и дополнительно содержащее антитело-агонист, или оно может содержать слитый полипептид, содержащий анти-MCT1 антитело в соответствии с данным изобретением, которое слито с другим иммунодепрессивным полипептидом или другим активным агентом. В качестве альтернативы указанные фрагменты могут вводиться как отдельные или дискретные объекты (одновременно или последовательно) в одной и той же или разных композициях для снижения иммунных ответов, опосредованных иммунными клетками, у субъекта.

[354] Примеры специфических иммуноингибирующих молекул, которые можно комбинировать с анти-MCT1 антителами по данному изобретению, включают в себя антитела, которые блокируют костимуляторный сигнал (например, против CD28 или ICOS), антитела, которые активируют ингибирующий сигнал через CTLA4, и/или антитела против других иммунных клеточных маркеров (например, против CD40, лиганда CD40 или цитокинов), слитые белки (например, CTLA4-Fc или PD-1-Fc) и иммунодепрессанты (например, рапамицин, циклоспорин A или FK506).

[355] В дополнительном варианте осуществления биспецифические антитела, содержащие анти-MCT1 антитела в соответствии с данным изобретением, являются пригодными для целенаправленного воздействия на конкретную популяцию клеток, например, с использованием маркера, обнаруженного только на определенном типе клеток, например, активированных T-клетках или B-лимфоцитах. Снижение иммунного ответа путем блокирования MCT1 является пригодным для подавления иммунного ответа, например, в ситуациях трансплантации тканей, кожи и органов, при заболевании трансплантат против хозяина (GVHD) или аллергии, или при аутоиммунных и воспалительных заболеваниях, таких как системная красная волчанка, эритематоз, IBD, RA, псориаз и рассеянный склероз. Например, блокирование функции MCT1 приводит к уменьшению разрушения ткани при трансплантации ткани. В типичном случае при трансплантации ткани отторжение трансплантата инициируется посредством его распознавания иммунными клетками как чужеродного, после чего следует

иммунная реакция, которая разрушает трансплантат. Введение молекулы, которая ингибирует МСТ1 на иммунных клетках отдельно или в сочетании с другим агентом, снижающим иммунитет, до или во время трансплантации, может ингибировать генерацию костимулирующего сигнала. Кроме того, блокирование МСТ1 также может быть достаточным для анергизации иммунных клеток, вызывая тем самым толерантность у субъекта.

[356] Для достижения достаточной иммуносупрессии или толерантности при некоторых заболеваниях или у некоторых субъектов может потребоваться блокирование костимулирующей функции других молекул. Например, может быть предпочтительным блокировать функцию В7-1 и В7-2 путем введения растворимой формы комбинации пептидов, обладающих активностью каждого из этих антигенов, или блокирования антител против этих антигенов (по отдельности или вместе в одной композиции) до или во время трансплантации. В качестве альтернативы может быть предпочтительным блокировать МСТ1 и дополнительно ингибировать костимулирующую активность В7-1 и/или В7-2.

[357] Указанные анти-МСТ1 антитела особенно пригодны при лечении аутоиммунного заболевания. Многие аутоиммунные нарушения являются результатом неадекватной активации иммунных клеток, которые реагируют против собственной ткани и способствуют выработке цитокинов и аутоантител, участвующих в патологии заболеваний. Предупреждение активации аутореактивных иммунных клеток может уменьшать или устранять симптомы заболеваний. Введение исследуемых анти-МСТ1 антител может индуцировать антиген-специфическую толерантность аутореактивных иммунных клеток, что может привести к долговременному облегчению заболевания. Кроме того, совместное введение агентов, которые блокируют костимуляцию иммунных клеток путем нарушения взаимодействия рецептор-лиганд молекул В7 с костимуляторными рецепторами, может быть пригодным для ингибирования активации иммунных клеток для предупреждения выработки аутоантител или цитокинов, которые могут быть вовлечены в процесс заболевания.

[358] Снижение иммунного ответа посредством анти-МСТ1 антител также может быть пригодным при лечении аутоиммунной атаки аутологичных тканей. Таким образом, патологические состояния, которые вызваны или усугублены аутоиммунной атакой (например, болезнь сердца, инфаркт миокарда или атеросклероз), могут быть ослаблены или нормализованы путем ингибирования

MCT1. Следовательно, в объем данного изобретения входит модулирование патологических состояний, усугубляемых аутоиммунной атакой, таких как аутоиммунные нарушения (а также состояния, такие как сердечные заболевания, инфаркт миокарда и атеросклероз), путем ингибирования MCT1 с использованием анти-MCT1 человека антител, являющихся предметом данного изобретения.

[359] Как упоминалось ранее, эффективность анти-MCT1 антител в соответствии с данным изобретением для предупреждения или облегчения аутоиммунных и воспалительных нарушений может быть определена с использованием ряда хорошо охарактеризованных на животных моделей аутоиммунных и воспалительных заболеваний человека. Примеры включают в себя экспериментальный аутоиммунный энцефалит у мышей, системную красную волчанку у мышей MRL/lpr/lpr или гибридных мышей NZB, аутоиммунный коллагеновый артрит у мышей, сахарный диабет у мышей NOD и крыс BB и экспериментальную миастению у мышей. См., Paul ed., *Fundamental Immunology,* Raven Press, New York, 1989, pages 840-856.

[360] Ингибирование активации иммунных клеток дополнительно пригодно терапевтически при лечении аллергий и аллергических реакций, например, путем ингибирования продукции IgE. Анти-MCT1 антитела, являющиеся предметом данного изобретения, можно вводить субъекту-аллергику для ингибирования опосредованных иммунными клетками аллергических реакций у субъекта. Ингибирование MCT1 может сопровождаться воздействием аллергена в сочетании с соответствующими молекулами MHC. Аллергические реакции могут быть системными или локальными по природе, в зависимости от пути проникновения аллергена и характера отложения IgE в тучных клетках или базофилах. Таким образом, аллергические реакции, опосредованные иммунными клетками, можно ингибировать локально или системно путем введения рассматриваемых антител против MCT1 человека.

Лечение аутоиммунных, воспалительных или аллергических патологических состояний

[361] Антитела, фрагменты антител и фармацевтические композиции в соответствии с данным изобретением могут быть использованы для ингибирования активированных Т-клеток или В-клеток и для лечения патологических состояний, когда это является терапевтически предпочтительным, таких как аутоиммунитет, аллергия или воспалительные патологические

состояния. Указанные композиции будут содержать количество антитела или фрагмента антитела в соответствии с данным изобретением, эффективное для подавления активности В-клеток или активации или пролиферации Т-клеток или экспрессии цитокинов у субъекта, нуждающегося в этом. Такие аутоиммунные, воспалительные и аллергические патологические состояния включают, например, такие артритические состояния, как ревматоидный артрит (RA), псориатический артрит, псориаз, склеродермия, рассеянный склероз, волчанка, IBD, ITP, сахарный диабет, GvHD, саркоидоз, аллергическая астма и ассоциированная с гепатитом гепатотоксичность. Указанные антитела также можно использовать для ингибирования нежелательных Т-клеточных иммунных ответов против трансплантированных клеток, тканей или органов, таких как тканевые трансплантаты, клетки CAR-T или конструкции или клетки для генной терапии и т.п.

[362] Конкретные состояния, при которых антитела по данному изобретению могут использоваться отдельно или в сочетании с другими терапевтическими средствами, особенно другими молекулами иммунодепрессанта, включают синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), приобретенную атрофию селезенки, острый передний увеит, острый диссеминированный энцефаломиелит (ADEM), острый подагрический артрит, острый некротический геморрагический лейкоэнцефалит, острый или хронический синусит, острый гнойный менингит (или другие воспалительные заболевания центральной нервной системы), острое серьезное воспаление, болезнь Аддисона, адреналит, сахарный диабет у взрослых (сахарный диабет II типа), идиопатический гипопаратиреоз, развивающийся у взрослых (AOIH), агаммаглобулинемия, агранулоцитоз, васкулиты, в том числе васкулит, необязательно, васкулиты крупных сосудов, необязательно, ревматическая полимиалгия и гигантоклеточный (Такаясу) артрит, аллергические патологические состояния, аллергический контактный дерматит, аллергический дерматит, аллергический грануломатозный ангиит, аллергические нарушения гиперчувствительности, аллергический нейрит, аллергическая реакция, очаговая алопеция, тотальная алопеция, синдром Альпорта, альвеолит, необязательно аллергический альвеолит или фиброзный альвеолит, болезнь Альцгеймера, амилоидоз, боковой амилотрофический склероз (ALS; болезнь Лу Герига), расстройство, связанное с эозинофилами, необязательно эозинофилия, анафилаксия, анкилозирующий спондилит, ангиэктазия, опосредованный антителами нефрит, анти-GBM/анти-TBM нефрит, заболевания, связанные с

комплексом антиген-антитело, болезнь антигломерулярной базальной мембраны, синдром антифосфолипидных антител, антифосфолипидный синдром (APS), афты, афтозный стоматит, апластическая анемия, аритмия, артериосклероз, артериосклеротические расстройства, артрит, необязательно ревматоидный артрит, такой как острый артрит, или хронический ревматоидный артрит, хронические прогредиентный артрит, деформирующий артрит, аскариаз, аспергиллома, гранулемы, содержащие эозинофилы, аспергиллез, аспермиогенез, астма, необязательно бронхиальная астма, бронхиальная астма или аутоиммунная астма, атаксия-телеангиэктазия, атаксический склероз, атеросклероз, аутизм, аутоиммунная ангиодистрофия, аутоиммунная апластическая анемия, аутоиммунный атрофический гастрит, аутоиммунный сахарный диабет, аутоиммунное заболевание семенника и яичника, в том числе аутоиммунный орхит и оофорит, аутоиммунные расстройства, связанные с коллагенозом, аутоиммунная дизавтономия, аутоиммунное заболевание уха, необязательно аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AGED), аутоиммунные эндокринные заболевания, в том числе тиреоидит, такой как аутоиммунный тиреоидит, синдром аутоиммунной энтеропатии, аутоиммунная потеря аутоиммунных заболеваний, аутоиммунная потеря слуха, аутоиммунная потеря слуха, нарушение слуха, аутоиммунный гемолиз, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное гепатологическое расстройство, аутоиммунная гиперлипидемия, аутоиммунный иммунодефицит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный миокардит, аутоиммунная нейтропения, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунные полиэндокринопатии, аутоиммунный полигландулярный синдром I типа, аутоиммунная ретинопатия, аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура (ATP), аутоиммунное заболевание щитовидной железы, аутоиммунная крапивница, аутоиммунно-опосредованные желудочно-кишечные заболевания, аксональные и нейрональные невропатии, болезнь Бало, болезнь Бехчета, доброкачественные семейные и ишемически-реперфузионные повреждения, доброкачественный лимфоцитарный ангиит, болезнь Бергера (IgA нефропатия), легочная аллергия птицеводов, слепота, болезнь Бека, облитерирующий бронхиолит (без трансплантата) против NSIP, бронхит, бронхопневмонический аспергиллез, синдром Брутона, буллезный пемфигоид, синдром Каплана, кардиомиопатия, сердечно-сосудистая ишемия, синдром Каслмана, целиакия, целиакия-спру (глютеновая энтеропатия), церебральная дегенерация, церебральная ишемия и заболевание, сопровождающее

васкуляризацию, болезнь Шагаса, каналопатии, необязательно эпилепсию, каналопатии ЦНС, хориоретинит, хориоидит, аутоиммунное гематологическое заболевание, хронический активный контактный гепатит, хронический активный гепатит, хронический активный гепатит или хронический гепатит дерматит, хроническая эозинофильная пневмония, синдром хронической усталости, хронический гепатит, хронический гиперчувствительный пневмонит, хронический воспалительный артрит, хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIDP), хроническое трудно поддающееся лечению воспаление, хронический слизисто-кожный кандидоз, хроническая невропатия, необязательно IgM-полиневропатии или IgM-опосредованная полиневропатия, хроническое обструктивное заболевание дыхательных путей, хроническое воспалительное заболевание легких, хронический рецидивирующий мультифокальный остеомиелит (CRMO), хронический тиреоидит (тиреоидит Хашимото) или подострый тиреоидит, синдром Шурга-Штрауса, рубцовый пемфигоид/доброкачественный слизистый пемфигоид, воспалительные заболевания ЦНС, васкулит ЦНС, глютеновая болезнь, синдром Когана, холодовая агглютининовая болезнь, полипозный колит, колит, такой как язвенный колит, язвенный колит, коллагеновый колит, патологические состояния, включающие инфильтрацию Т-клеток и хронические воспалительные реакции, врожденный блок сердца, врожденная инфекция краснухи, положительная анемия Кумбса, болезнь коронарной артерии, миокардит Коксаки, синдром CREST (кальциноз, феномен Рейно), болезнь Крона, криоглобулинемия, синдром Кушинга, циклит, необязательно хронический циклит, гетерохронный циклит, иридоциклит или циклит Фукса, муковисцидоз, цитокин-индуцированная токсичность, глухота, дегенеративный артрит, демиелинизирующие заболевания, необязательно аутоиммунные демиелинизирующие заболевания, демиелинизирующие невропатии, болезнь денге, герпетиформный дерматит и атопический дерматит, дерматит, в том числе контактный дерматит, дерматомиозит, дерматозы с острыми воспалительными компонентами, болезнь Девика в (оптиконевромиелит), диабетическое расстройство большой артерии, диабетическая нефропатия, диабетическая ретинопатия, синдром Даймонда-Блэкфана, диффузный интерстициальный легочный фиброз, дилатационная кардиомиопатия, дискоидная волчанка, заболевания, связанные с диапедезом лейкоцитов, синдром Дресслера, контрактура Дюпюитрена, эховирусная инфекция, экзема, в том числе аллергическая или атопическая экзема,

энцефалит, такой как энцефалит Расмуссена и энцефалит лимбической системы и/или ствола мозга, энцефаломиелит, необязательно аллергический энцефаломиелит или аллергические энцефаломиелит и экспериментальный аллергический энцефаломиелит (EAE), эндартериальная гиперплазия, эндокардит, эндокринная офтальмопатия, эндометриоз, эндомиокардиальный фиброз, энофтальм факоанафилактический, эндофтальмит, энтерит аллергический, синдром эозинофилии-миалгии, эозинофильный фасциит, эпидемический кератоконъюнктивит, буллезный эпидермолиз (EBA), эписклера, эписклерит, вирусная инфекция Эпштейна-Барра, стойкая возвышающаяся эритема, узелковая лепрозомная эритема, фетальный эритробластоз, пищеводная дискинезия, первичная криоглобулинемия смешанного типа, этмоидальный синдром Эвана, экспериментальный аллергический энцефаломиелит (EAE), недостаточность фактора VIII, легкое фермера, ревматическая лихорадка, синдром Фелти, фибромиалгия, фиброзирующий альвеолит, филяриоз, фокальный сегментарный гломерулосклероз (FSGS), пищевое отравление, фронтальная атрофия желудка, гигантоклеточный артрит (височный артрит), гигантоклеточный гепатит, гигантоклеточная полимиалгия, гломерулонефрит, гломерулонефрит (GN) с нефротическим синдромом и без него, такой как хронический или острый гломерулонефрит (например, первичный GN), синдром Гудпасчера, подагрический артрит, синдром, ассоциированный с трансфузией гранулоцитов, гранулематоз, в том числе лимфоматоидный гранулематоз, гранулематоз с поливаскулитом (GPA), гранулематозный увеит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, каплевидный псориаз, параксизматическая гемоглобинурия, болезнь Хамман-Рич, болезнь Хашимото, энцефалит Хашимото, тиреоидит Хашимото, гемохроматоз, гемолитическая анемия или иммунная гемолитическая анемия, в том числе аутоиммунная гемолитическая анемия (AIHA), гемолитическая анемия, гемофилия A, пурпура Геноха-Шенлейна, герпес гестационный, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), гипералгезия, гипогаммаглобулинемия, гипогонадизм, гипопаратиоидный синдром, идиопатический несахарный синдром, идиопатический лицевой паралич, идиопатический гипотиреоидизм, идиопатическая IgA нефропатия, идиопатическая мембранозный GN или идиопатическая мембранозная нефропатия, идиопатический нефритный синдром, идиопатический легочный фиброз, идиопатическая спру, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ITP), IgA нефропатия, IgE-опосредованные заболевания, необязательно анафилаксия и

аллергический или атопический ринит, IgG4-связанный склерозирующая болезнь, регионарный илеит, нефрит иммунного комплекса, иммунные реакции, ассоциированные с острой и отсроченной гиперчувствительностью, опосредованной цитокинами и Т-лимфоцитами, иммуноопосредованная GN, иммунорегуляторные липопротеины, в том числе синдром взрослого или острого респираторного дистресса (ARDS), миозит с тельцами включения, инфекционный артрит, бесплодие вследствие антител против сперматозоидов, воспаление всей или части сосудистой оболочки, воспалительное заболевание кишечника (IBD), воспалительные гиперпролиферативные заболевания кожи, воспалительная миопатия, инсулинозависимый диабет (тип 1), инсулит, интерстициальный цистит, интерстициальная болезнь легких, интерстициальный фиброз легких, ирит, ишемическое нарушение перфузии, воспаление суставов, ювенильный артрит, ювенильный дерматомиозит, ювенильный сахарный диабет (тип I), в том числе детский инсулинозависимый сахарный диабет (IDDM), ювенильный ревматоидный артрит синдром, синдром Кавасаки, синдром сухого глаза, кипаносомоз, болезнь Ламберта-Итона синдром, лейшманиоз, проказа, лейкопения, дефицит адгезии лейкоцитов, лейкоцитокластический васкулит, лейкопения, красный плоский лишай, склерозный лишай, конъюнктивит прямой кишки, линейный IgA дерматоз, линейная IgA болезнь (LAD), синдром Лоффлера, люпоидный гепатит, системная красная волчанка (в том числе нефрит, церебрит, детский непочечный, внепочечный, дискоидный, алопеция), системная красная волчанка (SLE), диссеминированная красная волчанка, артрит Лайма, болезнь Лайма, лимфоидный интерстициальный пневмонит, малярия, мужское и женское аутоиммунное бесплодие, верхнечелюстная артерия, васкулиты средних сосудов, включая болезнь Кавасаки и узелковый полиартерит), мембрано- или мембранозный пролиферативный GN (MPGN), включая тип I и тип II, и быстро прогрессирующий GN, мембранозный GN (мембранозная нефропатия), болезнь Меньера, менингит, микроскопический колит, микроскопический полиангиит, мигрень, нефропатия с минимальными изменениями, смешанные заболевания соединительной ткани (MCTD), инфекционный мононуклеоз, язва Мурена, болезнь Муча-Хабермана, многоочаговая моторная невропатия, множественная эндокринная недостаточность, синдром множественного поражения органов, такой как синдром, вторичный по отношению к септицемии, травмы или кровоизлияния, синдром множественного поражения органов, рассеянный склероз (MS), такой как спинооптический MS, рассеянный склероз, эпидемический

паротит, мышечные расстройства, миастения, такая как миастения, связанная с тимомой, миастения, миокардит, миозит, нарколепсия, некротический энтероколит и трансмуральный колит, аутоиммунное воспалительное заболевание кишечника, некротический, кожный или гиперчувствительный васкулит, синдром неонатальной волчанки (NLE), нефроз, нефротический синдром, неврологическое заболевание, оптический невромиелит (Девича), оптический невромиелит, нейромиотония, нейтропения, незлокачественный лимфоцитоз, негранулематозный увеит, незлокачественная тимома, воспалительные расстройства глаз и глазниц, глазной рубцовый пемфигоид, оофорит, симпатическая офтальмия, опсо-миоклональный синдром (OMS) и сенсорная невропатия, нейрит зрительного нерва, грануломатозный орхит, остеоартрит, палиндромный ревматизм, панкреатит, панцитопения, PANDAS (аутоиммунные психоневрологические расстройства у детей, ассоциированные с Streptococcus), паранеопластическая мозжечковая дегенерация, паранеопластический синдром, паранеопластические синдромы, в том числе неврологические паранеопластические синдромы, необязательно миастенический синдром Ламберт-Итона, паразитарные заболевания, такие как лейшмания, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), синдром Парри Ромберга, воспаление pars planitis (периферический увеит), синдром Парсоннажа-Тернера, парвовирусная инфекция, пемфигоид, такой как буллезный пемфигоид и кожный пемфигоид, пемфигоид (в том числе вульгарный пемфигоид), эритематозная пузырчатка, листовидная пузырчатка, пемфигоид слизистых - мембранный пемфигоид, пемфигоид, пептическая язва, периодический паралич, периферическая невропатия, перивенозный энцефаломиелит, пернициозная анемия (анемия пернициозная), пернициозная анемия, факоантигенный увеит, пневмоцирроз, синдром POEMS, узелковые полиартрит, тип I, II и III, полиартрит хронический первичный, полихондрит (например, рефрактерный или рецидивирующий полихондрит), полиэндокринная аутоиммунная болезнь, полиэндокринная недостаточность, полигландулярные синдромы, необязательно аутоиммунные полигландулярные синдромы (или полигландулярные эндокринопатологические синдромы), ревматическая полимиалгия, полимиозит, полимиозит/дерматомиозит, полинейропатии, острый полирадикулит, синдром постмиокардиального инфаркта, синдром постперикардиотомии, постстрептококковый нефрит, поствакцинальный первичный синдром, первичный первичный гипофиз, синдром первичного гипофиза, первичная гипофизарная

дистрофия идиопатическая микседема, первичный лимфоцитоз, который включает моноклональный В-клеточный лимфоцитоз, необязательно доброкачественная моноклональная гаммопатия и моноклональная гаммопатия неопределенного значения, MGUS, первичная микседема, первичная прогрессирующая MS (PPMS) и рецидивирующий ремиттирующий гематоз (RRMS), первичный склеротирующий холангит, прогестероновый дерматит, прогрессирующий системный склероз, пролиферативный артрит, псориаз, такой как бляшечный псориаз, псориаз, псориатический артрит, легочный альвеолярный протеиноз, легочная инфильтрационная эозинофилия, чисто эритроцитарная анемия или аплазия (PRCA), чисто эритроцитарная аплазия, гнойный или негнойный синусит, пустулезный псориаз и псориаз ногтей, пиелит, гангренозная пиодермия, тиреоидит Кервена, феномен Рейно, реактивный артрит, рецидивирующий аборт, снижение реакции артериального давления, рефлекторная симпатическая дистрофия, рефрактерный спру, болезнь или синдром Рейтера, рецидивирующий полихондрит, реперфузионное повреждение миокарда или других тканей, респираторный дистресс-синдром, синдром беспокойных ног, аутоиммунное заболевание сетчатки, забрюшинный фиброз, синдром Рейно, ревматические заболевания, ревматическая лихорадка, ревматизм, ревматоидный артрит, ревматоидный спондилит, инфекция вируса краснухи, синдром Самптера, саркоидоз, шистозомоз, синдром Шмидта, болезни, ассоциированные с SCID и вирусом Эпштейна-Барра, склера, склерит, склеродактиль, склеродермия, необязательно системная склеродермия, склерозирующий холангит, рассеянный склероз, склероз, такой как системный склероз, потеря слуха, серонегативные спондилоартриты, синдром Шихана, синдром Шульмана, силикоз, синдром Шегрена, аутоиммунное заболевание, связанное со сперматозоидами и семенниками, клиновидный синусит, синдром Стивенса-Джонсона, синдром неподвижного человека (или тяжелого человека), подострый бактериальный эндокардит (SBE), подострая кожная системная красная волчанка, внезапная потеря слуха, синдром Сусака, хорея Сиденхема, симпатическая офтальмия, системная красная волчанка (SLE), кожная SLE, системный некротизирующий васкулит, ANCA-ассоциированный васкулит, необязательно васкулит Чарг-Стросс или синдром (CSS), сухотка спинного мозга, артериит Такаясу, телеангиэктазия, височный артериит/артерит гигантских клеток, тромбангиит убитеранс, тромбоцитопения, в том числе тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (TTP) и аутоиммунная или

иммуноопосредованная тромбоцитопения, такая как идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ITP), включая хроническую или острую ITP, тромбоцитопеническую пурпуру (ITP), тиреотоксикоз, повреждение тканей, синдром Толоса-Ханта, токсический эпидермальный некролиз, синдром токсического шока, трансфузионный шок, трансфузионная реакция, преходящая гипогаммаглобулинемия у детей раннего возраста, поперечный миелит, тропическая легочная эозинофилия, туберкулез, язвенный колит, недифференцированная болезнь соединительной ткани (UCTD), крапивница, необязательно хроническая аллергическая крапивница и хроническая идиопатическая крапивница, в том числе хроническая аутоиммунная крапивница, увеит, передний увеит, увеоретинит, вальвулит, сосудистая дисфункция, васкулит, позвоночный артрит, везикулобуллезный дерматоз, витилиго, гранулематоз Вегенера (гранулематоз с полиангиитом (GPA)), синдром Вискотта-Олдрича или X-сцепленный гипер-IgM синдром.

[363] Следует понимать, что обозначенные в данном документе патологические состояния предназначены для иллюстрации и не являются исчерпывающими.

[364] В соответствии, по меньшей мере, с некоторыми вариантами осуществления анти-MCT1 антитела, их фрагменты, их конъюгаты или фармацевтическая композиция, содержащая то же самое, как описано в данном документе, которые функционируют для снижения MCT1-опосредованного транспорта лактозы, могут использоваться для лечения заболеваний, связанных с иммунной системой.

[365] Необязательно, патологическое состояние, связанное с иммунной системой, включает в себя состояние, связанное с иммунитетом, аутоиммунные заболевания, как указано в данном документе, системную красную волчанку, отторжение трансплантата и заболевание трансплантат против хозяина и/или для блокирования активированных Т-клеток и В-клеток, заболевания, связанные с иммунитетом, как указано в данном документе, и/или для иммунотерапии (ингибирования иммунной стимуляции).

[366] Необязательно иммунное патологическое состояние выбирают из аутоиммунного заболевания, отторжения трансплантата, воспалительного заболевания, аллергического патологического состояния или заболевания трансплантат против хозяина. В конкретном варианте осуществления анти-MCT1 антитела по данному изобретению можно использовать для лечения системной

красной волчанки. В одном варианте осуществления анти-MCT1 антитела по данному изобретению можно использовать для лечения заболевания трансплантат против хозяина (GVHD). В другом варианте осуществления анти-MCT1 антитела по данному изобретению можно использовать для лечения отторжения трансплантата. В еще одном варианте осуществления анти-MCT1 антитела по данному изобретению можно использовать для лечения сахарного диабета I типа. В одном варианте осуществления анти-MCT1 антитела по данному изобретению можно использовать для лечения сахарного диабета II типа. В другом варианте осуществления анти-MCT1 антитела по данному изобретению можно использовать для лечения ожирения.

[367] В конкретном варианте осуществления Ат1 к MCT1 можно использовать для лечения системной красной волчанки. В одном варианте осуществления Ат1 к MCT1 можно использовать для лечения заболевания трансплантат против хозяина (GVHD). В другом варианте осуществления Ат1 к MCT1 можно использовать для лечения отторжения трансплантата. В еще одном варианте осуществления Ат1 к MCT1 можно использовать для лечения сахарного диабета I типа. В одном варианте осуществления Ат1 к MCT1 можно использовать для лечения сахарного диабета II типа. В другом варианте осуществления Ат1 к MCT1 можно использовать для лечения ожирения. В равной степени в каждом из этих вариантов осуществления можно использовать вариант или слитый белок, содержащий одну или несколько CDR Ат1 к MCT1.

[368] Необязательно лечение комбинируют с другим компонентом, пригодным для лечения патологического состояния, связанного с иммунитетом, например, метформином.

[369] Таким образом, лечение системной красной волчанки с использованием антител в соответствии в данным изобретением может сочетаться, например, с любым известным терапевтическим агентом или способом лечения системной красной волчанки, необязательно, как описано в данном документе. Аналогичным образом, лечение GVHD с использованием антител в соответствии с данным изобретением может сочетаться, например, с любым известным терапевтическим агентом или способом лечения GVHD, необязательно, как описано в данном документе. Лечение рассеянного склероза с использованием агентов в соответствии, по меньшей мере, с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения может сочетаться, например, с любым известным

терапевтическим агентом или способом лечения рассеянного склероза, необязательно, как описано в данном документе. Аналогичным образом, лечение ревматоидного артрита или другого артрита, с использованием антител по данному изобретению, может сочетаться, например, с любым известным терапевтическим агентом или способом лечения ревматоидного артрита, необязательно, как описано в данном документе. Кроме того, лечение сахарного диабета 1 типа с использованием антител в соответствии с данным изобретением может сочетаться, например, с любым известным терапевтическим агентом или способом лечения сахарного диабета 1 типа, необязательно, как описано в данном документе. Лечение псориаза с использованием антител по данному изобретению может сочетаться, например, с любым известным терапевтическим агентом или способом лечения псориаза, необязательно, как описано в данном документе.

[370] В вышеописанных видах лечения, например, субъекту с одним из вышеупомянутых или другими аутоиммунными или воспалительными патологическими состояниями будет вводиться анти-MCT1 антитело, раскрытое в данном документе, или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с данным изобретением, при этом указанное антитело подавляет активированные Т-клетки и/или В-клетки и/или продуцирование провоспалительных цитокинов, которые участвуют в патологии заболевания, тем самым предотвращая или ослабляя симптомы заболевания и потенциально приводя к длительной ремиссии заболевания, например, из-за индукции Treg, которые вызывают толерантность к Т-клеткам или длительную иммуносупрессию.

[371] Терапевтические агенты и/или фармацевтическую композицию, содержащую их, как указано в данном документе, в соответствии, по меньшей мере, с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения, можно вводить в качестве единственного активного ингредиента или вместе с другими лекарственными средствами в схемах иммуномодуляции или другими противовоспалительными агентами, например, для лечения или предупреждения острого или хронического отторжения алло- или ксенотрансплантата, или воспалительных или аутоиммунных расстройств, или для индукции толерантности.

Лечение рака

[372] Виды рака, который можно лечить, включает в себя опухоли, которые не являются васкуляризованными или еще по сути не являются васкуляризированными, а также васкуляризованные опухоли. Виды рака могут включать в себя не солидные опухоли (такие как гематологические опухоли, например, лейкемии и лимфомы) или могут включать в себя солидные опухоли. Типы рака, подлежащие лечению антителами по данному изобретению, включают в себя, но не ограничиваясь ими, карциному, бластому и саркому, а также определенные видов лейкозов и лимфоидные злокачественные опухоли, доброкачественные и злокачественные опухоли и злокачественные опухоли, например, саркомы, карциномы и меланомы. Опухоли /виды рака взрослых и опухоли/виды рака детей также включены.

[373] Гематологические виды рака представляют собой рак крови или костного мозга. Примеры гематологических (или гематогенных) видов рака включают лейкозы, в том числе острые лейкозы (такие как острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз и миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный (эритроцитарный лейкоз), хронический лейкемический лейкоз) лейкоз, хронический миелогенный лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз), истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому (вялотекущие формы и формы с высокой степенью злокачественности), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миедиспластический синдром, лейкоз волосковых клеток и миелодисплазию.

[374] Солидные опухоли представляют собой аномальные массы ткани, которые обычно не содержат кист или жидких областей. Солидные опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными. Различные типы солидных опухолей названы по типу клеток, которые их образуют (например, саркомы, карциномы и лимфомы). Примеры солидных опухолей, таких как саркомы и карциномы, включают фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеосаркому и другие саркомы, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, рак толстой кишки, злокачественную опухоль лимфоидной системы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, раковые заболевания легких, рак яичников, рак предстательной железы, гепатоцеллюлярную карциному, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную

карциному, аденокарциному, рак потовых желез, медуллярную карциному щитовидной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, феохромоцитомы, карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, карциному почечных клеток, гепатому, карциному желчных протоков, хориокарциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль семенника, семиному, рак мочевого пузыря, меланому и опухоли ЦНС (такие как глиома (например, глиома ствола мозга и смешанные глиомы), глиобластома (также известная как мультиформная глиобластома), астроцитома, лимфома ЦНС, герминома, медуллобластома, шванномная краниофарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, нейрома слухового нерва, олигодендроглиома, менангиома, нейробластома, ретинобластома и метастазы в головной мозг).

[375] Предпочтительно антитела по данному изобретению используют для лечения рака, при котором опухолевые клетки являются позитивными в отношении экспрессии MCT1. Как правило, MCT1 положительные опухолевые клетки могут быть идентифицированы известными способами. Например, экспрессия MCT1 на опухолевых клетках может быть идентифицирована с помощью иммунофлуоресценции или проточной цитометрии с использованием антител по данному изобретению. В качестве альтернативы экспрессия MCT1 может быть измерена функционально посредством наблюдения ингибирования антителами по данному изобретению против целевых клеток.

[376] Биопсия представляет собой удаление ткани и/или клеток у индивидуума. Такое удаление может состоять в том, чтобы собирать ткани и/или клетки от индивидуума для проведения экспериментов на удаленной ткани и/или клетках. Данный эксперимент может включать в себя эксперименты для определения того, имеет ли индивидуум и/или страдает ли он от определенного патологического состояния или состояния болезни. Патологическое состояние или заболевание может представлять собой, например, рак. Что касается обнаружения наличия опухолевых клеток, экспрессирующих MCT1, у хозяина, образец, содержащий клетки хозяина, может представлять собой образец, содержащий цельные клетки, их лизаты или фракцию лизатов цельных клеток, например ядерную или цитоплазматическую фракцию, фракцию целого белка или фракцию нуклеиновой кислоты. Если образец содержит цельные клетки, то клетками могут быть любые

клетки хозяина, например, клетки любого органа или ткани, включая клетки крови или эндотелиальные клетки.

Лечение других MCT1-ассоциированных патологических состояний, например, EIHI

[377] Антитела и фрагменты антител по данному изобретению также могут быть использованы для лечения, предупреждения или диагностики любых других патологических состояний, нарушений или заболеваний, включающих экспрессию MCT1 в здоровых или патологических клетках. Например, в данном изобретении также предусмотрен способ лечения или профилактики EIHI у субъекта, при этом способ включает введение антител или фрагментов антител в соответствии с данным изобретением.

Способы введения

[378] Композиции по данному изобретению можно вводить несколькими способами в зависимости от того, предпочтительно ли местное или системное лечение.

[379] Как правило, введение может быть местным, парентеральным или энтеральным.

[380] Композиции по данному изобретению обычно подходят для парентерального введения. Используемый в данном документе термин «парентеральное введение» фармацевтической композиции включает любой путь введения, характеризующийся физическим повреждением ткани субъекта и введением фармацевтической композиции через нарушение в ткани, что обычно приводит к прямому введению в кровоток, в мышцу или во внутренний орган. Парентеральное введение, таким образом, включает, но не ограничиваясь ими, введение фармацевтической композиции путем инъекции композиции, нанесения композиции через хирургический разрез, нанесения композиции через проникающую в ткань нехирургическую рану и т.п. В частности, предполагается, что парентеральное введение включает, но не ограничиваясь ими, подкожное, внутрибрюшинное, внутримышечное, интрастернальное, внутривенное, внутриартериальное, интратекальное, внутрижелудочковое, интрауретральное, внутричерепное, внутриопухолевое, внутрисиновиальное введение или инфузии; и диалитические методики почечной инфузии. В предпочтительном варианте

осуществления парентеральное введение композиций по данному изобретению включает подкожное или внутрибрюшинное введение.

[381] Составы фармацевтической композиции, подходящей для парентерального введения, в типичном случае содержат активный ингредиент в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, таким как стерильная вода или стерильный изотонический солевой раствор. Такие составы могут быть приготовлены, упакованы или проданы в форме, подходящей для болюсного введения или для непрерывного введения. Инъецируемые препараты могут быть приготовлены, упакованы или проданы в стандартной лекарственной форме, такой как ампулы или контейнеры с множеством доз, содержащие консервант. Композиции для парентерального введения включают, но не ограничиваются ими, суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных носителях, пасты и т.п. Такие составы могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, включая, но не ограничиваясь ими, суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие агенты. В одном варианте осуществления композиции для парентерального введения активный ингредиент предоставляется в сухой (т.е., порошковой или гранулированной) форме для восстановления подходящим носителем (например, стерильной апирогенной водой) перед парентеральным введением восстановленной композиции. Парентеральные составы также включают водные растворы, которые могут содержать наполнители, такие как соли, углеводы и буферные агенты (например, до pH от 3 до 9), но для некоторых применений они могут быть более подходящим образом приготовлены в виде стерильного неводного раствора или в виде высушенной формы для использования в сочетании с подходящим носителем, таким как стерильная апирогенная вода. Иллюстративные формы для парентерального введения включают растворы или суспензии в стерильных водных растворах, например, водных растворах пропиленгликоля или декстрозы. Такие лекарственные формы могут быть подходящим образом забуферены, при необходимости. Другие парентерально применяемые составы, которые являются пригодными, включают составы, которые содержат активный ингредиент в микрокристаллической форме или в липосомном препарате. Составы для парентерального введения могут быть составлены для немедленного и/или модифицированного высвобождения. Составы с модифицированным высвобождением включают отсроченное, длительное, импульсное, контролируемое, целевое и запрограммированное высвобождение.

[382] Термины «пероральный», «энтеральный», «энтерально», «перорально», «непарентеральный», «непарентерально» и т.п., относятся к введению соединения или композиции индивидууму путем или способом по пищеварительному каналу. Примеры «пероральных» путей введения композиции включают, но не ограничиваются ими, глотание жидких или твердых форм композиции изо рта, введение композиции через назоеюнальную или гастростомическую трубку, интрадуоденальное введение композиции и ректальное введение, например, используя суппозитории для нижнего отдела кишечного тракта пищеварительного канала.

[383] Предпочтительно составленная композиция, содержащая выделенные анти-МСТ1 антитела или фрагменты антител, является подходящей для введения посредством инъекции.

[384] Фармацевтические композиции и составы для местного применения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости, полутвердые, монофазные композиции, многофазные композиции (например, масло в воде, вода в воде), пены, микрогубки, липосомы, наноэмульсии, аэрозольные пены, полимеры, фуллерены и порошки. Могут быть необходимы или предпочтительны стандартные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и т.п.

[385] Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, суспензии или растворы в воде или неводной среде, капсулы, саше или таблетки. Загустители, ароматизаторы, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие добавки или связующие вещества могут быть предпочтительны.

[386] Композиции и составы для парентерального, интратекального или внутрижелудочкового введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки, такие как, но не ограничиваясь ими, усилители проникновения, другие соединения и другие фармацевтически приемлемые носители или наполнители.

[387] Фармацевтические композиции по данному изобретению включают, но не ограничиваются ими, растворы, эмульсии и липосомосодержащие составы. Указанные композиции могут быть получены из множества компонентов, которые включают, но не ограничиваются ими, предварительно отформованные жидкости,

самоэмульгирующиеся твердые лекарственные формы и самоэмульгирующиеся мягкие лекарственные формы.

[388] Фармацевтические композиции по данному изобретению, которые могут быть удобно представлены в стандартной лекарственной форме, могут быть получены в соответствии с общепринятыми методиками, хорошо известными в фармацевтической промышленности. Такие методики включают стадию объединения активных ингредиентов с фармацевтическим (фармацевтическими) носителем (носителями) или наполнителем (наполнителями). Как правило, составы готовят путем равномерного и тщательного объединения активных ингредиентов с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями или обоими, а затем, при необходимости, придания формы продукту.

[389] Композиции по данному изобретению могут быть составлены в любую из множества возможных лекарственных форм, таких как, но не ограничиваясь ими, таблетки, капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели, суппозитории, аэрозоли и клизмы. Композиции по данному изобретению также могут быть приготовлены в виде суспензий в водных, неводных или смешанных средах. Водные суспензии могут дополнительно содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, включая, например, натрий карбоксиметилцеллюлозу, сорбит и/или декстран. Необязательно суспензия также может содержать стабилизаторы.

[390] В одном варианте осуществления данного изобретения фармацевтические композиции могут быть составлены и использованы в качестве пен. Фармацевтические пены включают составы, такие как, но не ограничиваясь ими, эмульсии, микроэмульсии, кремы, гели и липосомы. Хотя эти составы в основном схожи по природе, они различаются по компонентам и консистенции конечного продукта. Агенты, которые усиливают поглощение олигонуклеотидов на клеточном уровне, также могут быть добавлены к фармацевтическим и другим композициям по данному изобретению. Например, катионные липиды, такие как липофектин (патент США № 5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (WO 97/30731), также усиливают клеточное поглощение олигонуклеотидов.

[391] Композиции по данному изобретению могут дополнительно содержать другие дополнительные компоненты, обычно встречающиеся в фармацевтических композициях. Так, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные материалы, такие как, например,

противозудные, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные агенты, или могут содержать дополнительные материалы, пригодные для физического составления различных лекарственных форм композиций по данному изобретению, таких как красители, вкусовые агенты, консерванты, антиоксиданты, дезактиваторы, загустители и стабилизаторы. Однако такие материалы при добавлении не должны чрезмерно нарушать биологическую активность компонентов композиций по данному изобретению. Составы могут быть стерилизованы и, при необходимости, смешаны со вспомогательными агентами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими агентами, эмульгаторами, солями для воздействия на осмотическое давление, буферами, красителями, ароматизаторами и/или ароматическими веществами и т.п., которые не оказывают вредного влияния на нуклеиновую (нуклеиновые) кислоту (кислоты) состава.

[392] Композиции, содержащие анти-MCT1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, могут включать фармацевтически приемлемый (приемлемые) наполнитель (наполнители). Наполнители, включенные в составы, будут иметь разные цели в зависимости, например, от антитела и способа введения. Примеры обычно используемых наполнителей включают, но не ограничиваются ими: солевой раствор, забуференный солевой раствор, декстрозу, воду для инфекции, глицерин, этанол и их комбинации, стабилизирующие агенты, солюбилизирующие агенты и поверхностно-активные вещества, буферы и консерванты, агенты тоничности, наполнители и смазывающие агенты. Композиции, содержащие анти-MCT1 антитела, обычно готовят и культивируют в отсутствие каких-либо компонентов, не относящихся к человеку, таких как сыворотка животного происхождения (например, бычий сывороточный альбумин).

[393] Состав или композиция также могут содержать более одного активного ингредиента, пригодного для конкретного показания, заболевания или патологического состояния, которое лечат связывающими молекулами или клетками, например, с активностями, комплементарными связывающей молекуле или клетке, где соответствующие активности не оказывают неблагоприятного действия друг на друга. Такие активные ингредиенты подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для предполагаемой цели. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно включает другие фармацевтически

активные агенты или лекарственные средства, такие как химиотерапевтические агенты, например, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевину, метотрексат, паклитаксел, ринитекс, рибаксакс , винкристин и т.д. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически активные агенты или лекарственные средства могут включать ингибиторы иммунной контрольной точки, например лекарственные средства, которые нацелены на PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG3, CTLA4, KIR, CD244, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, GAL9, TIM3 и/или A2aR. Примеры указанных ингибиторов включают, но не ограничиваются ими, пидилизумаб, ниволумаб, пембролизумаб, атезолизумаб, MDX-1105, BMS-936559, MEDI4736, MPDL3280A, MSB0010718C, тремелимумаб и ипилимумаб, которые можно вводить отдельно или в комбинации с другими средствами в комбинации или, например, GM-CSF.

[394] Антитела можно комбинировать с другими терапевтическими средствами, которые можно вводить в одной и той же или разных композициях, в одно и то же или в другое время и в любом порядке. Например, антитела по данному изобретению могут вводиться в терапевтической схеме, которая включает введение агониста PD-1 или PD-L1, CTLA4-Ig, цитокина, агониста или антагониста цитокина или другого агониста или антагониста рецептора.

[395] Фармацевтическая композиция в некоторых аспектах может использовать системы доставки с замедленным высвобождением, с отсроченным высвобождением и с длительным высвобождением, так что доставка композиции происходит до и с достаточным временем, чтобы вызвать сенсибилизацию участка, подлежащего лечению. Многие типы систем доставки с высвобождением доступны и известны. Такие системы могут предупреждать повторное введение композиции, тем самым увеличивая удобство для субъекта и врача.

Дозирование

[396] Фармацевтическая композиция в некоторых вариантах осуществления содержит анти-MCT1 антитела или фрагменты антител в количествах, эффективных для лечения или предотвращения заболевания или патологического состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество. Терапевтическая или профилактическая эффективность в некоторых вариантах осуществления контролируется путем периодической оценки подвергнутых лечению субъектов.

Для повторных введений в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение повторяют до тех пор, пока не произойдет предпочтительное подавление симптомов заболевания. Тем не менее, другие схемы дозировки могут быть пригодны и могут быть определены. Необходимая доза может быть введена однократным болюсным введением композиции, многократным болюсным введением композиции или непрерывным инфузионным введением композиции.

[397] Антитела или фрагменты антител можно вводить в одной или нескольких дозах. В некоторых вариантах осуществления указанное эффективное количество антител можно вводить в виде однократной дозы. В некоторых вариантах осуществления указанное эффективное количество антител можно вводить в виде более чем одной дозы в течение периода времени. Время введения зависит от решения лечащего врача и зависит от клинического состояния пациента. Хотя индивидуальные потребности варьируются, определение оптимальных диапазонов эффективных количеств данного антитела для конкретного заболевания или состояний находится в компетенции специалиста в данной области техники. Эффективное количество означает количество, которое обеспечивает терапевтическое или профилактическое преимущество. Вводимая доза будет зависеть от возраста, состояния здоровья и веса реципиента, вида параллельного лечения, если таковое имеется, частоты лечения и характера необходимого эффекта. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество антител или композиции, содержащей эти антитела, вводят парентерально. В некоторых вариантах осуществления введение может представлять собой внутривенное введение. В некоторых вариантах осуществления введение может осуществляться непосредственно путем инъекции в область заболевания.

[398] Для целей данного изобретения количество или доза вводимых антител по данному изобретению должно быть достаточным для осуществления терапевтического или профилактического ответа у субъекта или животного в течение приемлемого периода времени. Например, доза антитела по данному изобретению должна быть достаточной для связывания с антигеном или выявления, лечения или предупреждения заболевания в течение периода от около 2 часов или дольше, например, от около 12 до около 24 или более часов, от времени введения. В определенных вариантах осуществления период времени

может быть даже более длинным. Доза будет определяться эффективностью конкретного антитела и состоянием животного (например, человека), а также массой тела животного (например, человека), подлежащего лечению.

[399] Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом носителя для получения единичной дозированной формы, будет варьироваться в зависимости от субъекта, которого лечат, и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом носителя для получения единичной дозированной формы, обычно будет таким количеством композиции, которое оказывает терапевтический эффект. Как правило, из ста процентов это количество будет составлять от около 0,01 процента до около девяноста девяти процентов активного ингредиента, например, от около 0,1 процента до около 70 процентов, чаще всего, например, от около 1 процента до около 30 процентов активного ингредиента в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

[400] Режимы дозирования могут быть скорректированы для обеспечения оптимального необходимого ответа (например, терапевтического эффекта). Например, можно вводить единичную болюсную дозу, несколько разделенных доз можно вводить в течение некоторого времени или дозу можно пропорционально снижать или повышать сообразно потребностям терапевтической ситуации. Особенно целесообразно составлять парентеральные композиции в единичную лекарственную форму для простоты введения и однородного дозирования. Стандартная лекарственная форма в данном документе относится к физически дискретным формам, подходящим для использования в качестве стандартных дозировок у субъекта, которого лечат; при этом каждая форма содержит предварительно определенное количество активного соединения, которое согласно вычислениям должно обеспечивать целевой терапевтический эффект, совместно с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для единичных лекарственных форм, в соответствии, по меньшей мере, с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения обусловлена и напрямую зависит от (a) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который нужно достигнуть, и (b) ограничений, свойственных для области техники составления такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидуумов.

[401] Для введения анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, раскрываемого в данном документе, дозировка находится в диапазоне от примерно 0,0001 до 100 мг/кг и, более обычно, от 0,01 до 5 мг/кг от массы тела хозяина. Например, дозировки могут составлять 0,3 мг/кг массы тела, 1 мг/кг массы тела, 3 мг/кг массы тела, 5 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или в пределах 1-10 мг/кг. Иллюстративный режим лечения включает введение один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз каждые четыре недели, один раз в месяц, один раз каждые 3 месяца или один раз каждые 3-6 месяцев. Предпочтительные схемы дозировки для антитела, раскрываемого в данном документе, в соответствии, по меньшей мере, с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения, включают 1 мг/кг массы тела или 3 мг/кг массы тела при внутривенном введении, при этом антитело, раскрываемое в данном документе, вводят с использованием одной из следующих схем дозирования: (i) каждые четыре недели для шести дозировок, затем каждые три месяца; (ii) каждые три недели; (iii) 3 мг/кг массы тела один раз, а затем 1 мг/кг массы тела каждые три недели.

[402] В некоторых способах два или более моноклональных антитела с различной специфичностью связывания вводят одновременно, и в этом случае дозировка каждого антитела, раскрываемого в данном документе, попадает в указанные диапазоны. Описанное в данном документе антитело обычно вводят несколько раз. Введение однократных доз могжет происходить, например, ежедневно, еженедельно, ежемесячно, каждые три месяца или ежегодно. Интервалы также могут быть нерегулярными, на что указывает измерение уровня антител в крови к целевому антигену у пациента. В некоторых способах дозировку регулируют до достижения концентрации антител в плазме крови около 1-1000 мкг/мл, а в некоторых способах около 25-300 мкг/мл.

[403] В качестве альтернативы терапевтический агент можно вводить в виде композиции с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота варьируются в зависимости от периода полувыведения терапевтического агента у пациента. В целом, человеческие антитела демонстрируют самый длинный период полужизни, за которым следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и не относящиеся к человеку антитела. Период полужизни для слитых белков может широко варьироваться. Дозировка и частота введения могут варьироваться в зависимости от того,

является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических целях относительно низкие дозы вводятся с относительно редкими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение до конца своей жизни. В терапевтических применениях иногда требуется относительно высокая доза с относительно короткими интервалами, пока прогрессирование заболевания не уменьшится или не прекратится, и, например, пока пациент не продемонстрирует частичное или полное улучшение симптомов заболевания. После этого пациенту может быть назначен профилактический режим.

[404] Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по данному изобретению можно варьировать, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения необходимого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества фармакокинетических факторов, включая активность конкретных используемых композиций по данному изобретению или их сложного эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости выведения из организма, конкретного используемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в сочетании с конкретными применяемыми композициями, возраста, пола, веса, патологического состояния, общего состояние здоровья и предыдущей истории болезни пациента, которого лечат, и подобные факторы хорошо известны в медицине.

[405] В некоторых вариантах осуществления антитела вводят как часть комбинированного лечения, например, одновременно или последовательно, в любом порядке, с другим терапевтическим вмешательством, таким как другое антитело или сконструированная клетка или рецептор или агент, такой как цитотоксический или терапевтический агент. Антитела в некоторых вариантах осуществления вводят совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами или в связи с другим терапевтическим вмешательством, либо одновременно, либо последовательно в любом порядке. В некоторых контекстах антитела вводят совместно с другой терапией, достаточно близкой по времени, так что антитела усиливают действие одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов или наоборот. В некоторых вариантах

осуществления антитела вводят до введения одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления антитела вводят после введения одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов.

Вариации

[406] В объем данного изобретения включены функциональные части антител по данному изобретению, описанных в данном документе. Термин «функциональная часть» при использовании в отношении антитела относится к любой части или фрагменту антитела по данному изобретению, причем эта часть или фрагмент сохраняет биологическую активность антитела, частью которого оно является (исходное антитело). Функциональные части включают, например, те части антитела, которые сохраняют способность распознавать целевые клетки или обнаруживать, лечить или предупреждать заболевание в аналогичной степени, той же самой степени или в большей степени, что и исходное антитело. Что касается исходного антитела, функциональная часть может включать, например, около 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% или более исходного антитела.

[407] Функциональная часть может содержать дополнительные аминокислоты на амино- или карбокси-конце части или на обоих концах, причем дополнительные аминокислоты не обнаружены в аминокислотной последовательности исходного антитела. Предпочтительно, чтобы дополнительные аминокислоты не нарушали биологическую функцию функциональной части, например, распознавали целевые клетки, выявляли рак, лечили или предупреждали рак и т.д. Более предпочтительно, чтобы дополнительные аминокислоты усиливали биологическую активность по сравнению с биологической активностью исходного антитела.

[408] В объем данного изобретения включены функциональные варианты антител по данному изобретению, описанных в данном документе. Используемый в данном документе термин «функциональный вариант» относится к антителу, полипептиду или белку, обладающему существенной или значительной идентичностью последовательности или сходством с исходным антителом, причем этот функциональный вариант сохраняет биологическую активность антитела, вариантом которого он является. Функциональные варианты охватывают, например, те варианты антитела, которые описаны в данном документе (исходное антитело), которые сохраняют способность распознавать

целевые клетки в аналогичной степени, той же самой степени или в большей степени, что и исходное антитело. Что касается исходного антитела, функциональный вариант может быть, например, по меньшей мере, на около 30, 50, 75, 80, 90, 98% или более идентичным по отношению к аминокислотной последовательности исходного антитела.

[409] Функциональный вариант может, например, содержать аминокислотную последовательность исходного антитела, по меньшей мере, с одной консервативной аминокислотной заменой. В качестве альтернативы или в качестве дополнения функциональные варианты могут содержать аминокислотную последовательность исходного антитела, по меньшей мере, с одной неконсервативной аминокислотной заменой. В этом случае предпочтительно, чтобы неконсервативная аминокислотная замена не нарушала или не ингибировала биологическую активность функционального варианта. Неконсервативная аминокислотная замена может усиливать биологическую активность функционального варианта, так что биологическая активность функционального варианта увеличивается по сравнению с исходным антителом.

[410] Аминокислотные замены антител по данному изобретению представляют собой, например, консервативные аминокислотные замены. Консервативные аминокислотные замены известны в данной области техники и включают аминокислотные замены, в которых одна аминокислота, имеющая определенные физические и/или химические свойства, заменяется другой аминокислотой, которая имеет такие же или подобные химические или физические свойства. Например, консервативная аминокислотная замена может представлять собой кислую/отрицательно заряженную полярную аминокислоту, замещенную другой кислой/отрицательно заряженной полярной аминокислотой (например, Asp или Glu), аминокислоту с неполярной боковой цепью, замещенную другой аминокислотой с неполярной боковой цепью (например, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Cys, Val и т.д.), основную/положительно заряженную полярную аминокислоту, замещенную другой основной/положительно заряженной полярной аминокислотой (например, Lys, His, Arg и т. д.), незаряженную аминокислоту с полярной боковой цепью, замещенную другой незаряженной аминокислотой с полярной боковой цепью (например, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr и т. д.), аминокислоту с бета-разветвленной боковой цепью, замещенную другой аминокислотой с бета-разветвленной боковой цепью (например, Ile, Thr и Val), аминокислоту с

ароматической боковой цепью, замещенную другой аминокислотой с ароматической боковой цепью (например, His, Phe, Trp и Tyr) и т.п.

[411] Кроме того, аминокислоты могут быть добавлены или удалены из последовательности на основе конструкции вектора.

[412] Антитело может состоять по сути из указанной аминокислотной последовательности или последовательностей, описанных в данном документе, так что другие компоненты, например, другие аминокислоты, не изменяют значительно биологическую активность функционального варианта.

[413] Антитела вариантов осуществления изобретения (включая функциональные части и функциональные варианты) могут быть любой длины, т.е., могут содержать любое количество аминокислот при условии, что антитела (или их функциональные части или функциональные варианты) сохраняют свою биологическую активность, например, способность специфически связываться с антигеном, обнаруживать патологические клетки у млекопитающего или лечить или предупреждать заболевание у млекопитающего и т.д. Например, антитело может иметь длину от около 50 до около 5000 аминокислот, такую как 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или более аминокислот.

[414] Антитела вариантов осуществления данного изобретения (включая функциональные части и функциональные варианты данного изобретения) могут содержать синтетические аминокислоты вместо одной или нескольких встречающихся в природе аминокислот. Такие синтетические аминокислоты известны в данной области техники и включают, например, аминоциклогексанкарбоновую кислоту, норлейцин, α-амино-н-декановую кислоту, гомосерин, S-ацетиламинометил-цистеин, транс-3- и транс-4-гидроксипролин, 4-аминофенилаланин, 4-нитрофенилаланин, 4-хлорфенилаланин, 4-карбоксифенилаланин, β-фенилсерин, β-гидроксифенилаланин, фенилглицин, α-нафтилаланин, циклогексилаланин, циклогексилглицин, индолин-2-карбоновую кислоту, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновую кислоту, моноамид аминомалоновой кислоты, N'-бензил-N'-метил-лизин, N',N'-дибензил-лизин, 6-гидроксилизин, орнитин, α-аминоциклопентанкарбоновую кислоту, α-аминоциклогексанкарбоновую кислоту, α-аминоциклогептанкарбоновую кислоту, α-(2-амино-2-норборнан)-карбоновую кислоту, α,γ-диаминомасляную кислоту, α, β-диаминопропионовую кислоту, гомофенилаланин и α-трет-бутилглицин.

[415] Антитела вариантов осуществления данного изобретению (включая функциональные части и функциональные варианты) могут быть гликозилированы, амидированы, карбоксилированы, фосфорилированы, этерифицированы, N-ацилированы, циклизованы, например, через дисульфидный мостик, или превращены в соль присоединения кислоты, и/или необязательно димеризованны или полимеризованны, или конъюгированны.

[416] Антитела вариантов осуществления данного изобретения (включая функциональные части и их функциональные варианты) могут быть получены способами, известными в данной области техники. Антитела могут быть получены любым подходящим способом получения полипептидов или белков. Подходящие способы синтеза полипептидов и белков de novo описаны в таких источниках, как Chan et al., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; *Peptide and Protein Drug Analysis*, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; *Epitope Mapping*, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2001; и патент США № 5449752. Также полипептиды и белки могут быть получены рекомбинантным способом с использованием нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, с использованием стандартных рекомбинантных способов. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, N Y, 1994. Кроме того, некоторые из антител по данному изобретению (включая функциональные части и их функциональные варианты) могут быть выделены и/или очищены из источника, такого как растение, бактерия, насекомое, млекопитающее, например, крыса, человек и т.д. Способы выделения и очистки хорошо известны в данной области техники. В качестве альтернативы антитела, описанные в данном документе (включая функциональные части и их функциональные варианты), могут быть коммерчески синтезированы компаниями. В этом отношении антитела по данному изобретению могут быть синтетическими, рекомбинантными, выделенными и/или очищенными.

[417] Антитела, имеющие последовательности V_H и V_L, раскрытые в данном документе, могут быть использованы для создания новых вариантов антител путем модификации последовательностей V_H и/или V_L или константной (константных) области (областей), присоединенной (присоединенных) к ним. Таким образом, структурные особенности вариантного антитела по данному

изобретению используются для создания структурно связанных вариантных антител, которые сохраняют, по меньшей мере, одно функциональное свойство антител по данному изобретению, такое как связывание с MCT1. Например, одна или несколько областей CDR одного анти-MCT1 вариантного антитела, например, одной из Ат1-Ат95 или их мутаций, могут быть рекомбинантно объединены с известными каркасными областями и/или другими CDR для создания дополнительных рекомбинантно сконструированных анти-MCT1 антител (например, антител, которые связываются с MCT1) по данному изобретению, как обсуждается в данном документе. Исходным материалом для способа конструирования может быть одна или несколько из представленных в данном документе последовательностей V_H и/или V_L или одна или несколько их областей CDR. Чтобы создать сконструированное антитело, нет необходимости фактически получать (т.е., экспрессировать в виде белка) антитело, имеющее одну или несколько последовательностей V_H и/или V_L, представленных в данном документе, или одну или несколько областей CDR. Скорее, информация, содержащаяся в последовательности (последовательностях), используется в качестве исходного материала для создания последовательности (последовательностей) «второго поколения», полученной из исходной (исходных) последовательности (последовательностей), и затем готовится последовательность (последовательности) «второго поколения» и экспрессируется в виде белка. Стандартные методики молекулярной биологии могут быть использованы для получения и экспрессии измененной последовательности антитела.

[418] Антитело, кодируемое измененной (измененными) последовательностью (последовательностями) антитела, может сохранять одно, некоторые или все функциональные свойства анти-MCT1 антител, полученных способами и с последовательностями, представленными в данном документе, причем эти функциональные свойства включают связывание с вариантным MCT1 или конъюгатом вариантного MCT1, с определенным уровнем K_D или менее, и/или модулирование активности иммунных клеток, и/или селективное связывание с необходимыми целевыми клетками, такими как, например, активные Т-клетки или В-клетки. Функциональные свойства измененных антител могут быть оценены с использованием стандартных анализов, доступных в данной области техники и/или описанных в данном документе.

[419] Мутации могут быть введены случайно или селективно по всей или части кодирующей последовательности анти-MCT1 антитела, и полученные в результате модифицированные анти-MCT1 антитела могут быть подвергнуты скринингу в отношении активности связывания и/или других предпочтительных функциональных свойств.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[420] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которому относится данное изобретение. Несмотря на то, что при разработке или исследовании данного изобретения можно применять способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, что описаны в данном документе, подходящие способы и материалы описаны в данном документе. Материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными, но не ограничивающими. Применяемые терминологии и лабораторные процедуры и методики, связанные с аналитической химией, химией органического синтеза и медицинской и фармацевтической химией, описанные в данном документе, хорошо известны и обычно применяются в данной области техники. Для химического синтеза, химического анализа, приготовления фармацевтического препарата, разработки состава, доставки лекарственной формы и лечения пациентов можно применять стандартные методики.

[421] Используемый в данном документе термин «5 кэп» (также называемый РНК-кэпом, РНК-7-метилгуанозиновым кэпом или РНК m^7G-кэпом) представляет собой модифицированный гуаниновый нуклеотид, который был добавлен к «переднему» или 5'-концу эукариотической информационной РНК вскоре после начала транскрипции. 5' кэп состоит из концевой группы, которая связана с первым транскрибированным нуклеотидом. Его присутствие имеет решающее значение для распознавания рибосомы и защиты от РНКаз. Добавление кэпа связано с транскрипцией и происходит ко-транскрипционно, так что каждый влияет друг на друга. Вскоре после начала транскрипции 5'-конец синтезируемой мРНК связывается кэп-синтезирующим комплексом, ассоциированным с РНК-полимеразой. Этот ферментативный комплекс катализирует химические реакции, которые необходимы для мРНК кэппинга. Синтез протекает в виде

многоступенчатой биохимической реакции. Кэппирующий фрагмент может быть модифицирован для модуляции функциональности мРНК, такой как ее стабильность или эффективность трансляции.

[422] Как используется в описании в данном документе и в последующей формуле изобретения, форма единственного числа включает в себя ссылку на множественное число, если контекст явно не предписывает иное.

[423] Термин «аллергическое заболевание», как используется в данном документе, в широком смысле относится к заболеванию, включающему аллергические реакции. Более конкретно, «аллергическое заболевание» определяется как заболевание, для которого идентифицирован аллерген, при этом существует высокая корреляция между воздействием этого аллергена и началом патологического изменения, и при этом было доказано, что это патологическое изменение имеет иммунологический механизм. В данном документе иммунологический механизм означает, что лейкоциты демонстрируют иммунный ответ на стимуляцию аллергеном.

[424] Термин «аллогенный» или «полученный от донора» относится к любому материалу, полученному от другого животного того же вида, что и индивидуум, которому этот материал вводится. Говорят, что два или более индивидов аллогенны друг другу, когда гены в одном или нескольких локусах не идентичны. В некоторых аспектах аллогенный материал от индивидуумов одного и того же вида может быть достаточно непохож генетически, чтобы взаимодействовать антигенно.

[425] Термин «аминокислота» относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично встречающимся в природе аминокислотам. Встречающимися в природе аминокислотами являются те, которые кодируются генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые впоследствии модифицируются (например гидроксипролин, γ-карбоксиглутамат и О-фосфосерин). Аминокислотные аналоги относятся к соединениям, которые имеют ту же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота (т.е., углерод, который связан с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой), и группу R (например, гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний). Аналоги могут иметь модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные

пептидные основные цепи, но сохраняют ту же самую основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые характеризуются структурой, которая отличается от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют аналогично встречающейся в природе аминокислоте.

[426] Используемый в данном документе термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном. В одном аспекте антиген представляет собой MCT1. Антитела могут представлять собой интактные иммуноглобулины, полученные из природных источников или из рекомбинантных источников, и могут представлять собой иммунореактивные части интактных иммуноглобулинов. Термин используется в самом широком смысле и включает в себя поликлональные и моноклональные антитела, включая интактные антитела и фрагменты функциональных (антигенсвязывающих) антител, в том числе фрагменты антигенсвязывающих (Fab) фрагментов, F $(ab')_2$ фрагменты, Fab'-фрагменты, Fv-фрагменты, рекомбинантные фрагменты IgG (rIgG), одноцепочечные фрагменты антител, включая вариабельные одноцепочечные фрагменты (scFv), ByTE, полипептиды мультиспецифических антител, диатела и фрагменты однодоменных антител (например, фрагменты sdAb, sdFv, нанотело). Термин охватывает генно-инженерные и/или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как интратела, пептидотела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгатные антитела, мультиспецифические, например, биспецифические антитела, диатела, триабеллы и тетрабела, тандемный ди-scFv и тандемный три-scFv. Если не указано иное, термин «антитело» следует понимать как охватывающий его функциональные фрагменты. Термин также охватывает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, включая IgG и его подклассы, IgM, IgE, IgA и IgD.

[427] Термин «антигенсвязывающий фрагмент» или «фрагмент антитела» относится к части интактного антитела и относится к антигенным детерминантам вариабельных областей интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты антигенсвязывающих (Fab) фрагментов, $F(ab')_2$-фрагменты, Fab'-фрагменты, Fv-фрагменты, рекомбинантные IgG (rIgG) фрагменты, одноцепочечные фрагменты антител, включая

одноцепочечные фрагменты вариабельные фрагменты (scFv), фрагменты однодоменных антител (например, sdAb, sdFv, нанотело), диатела и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединить с применением рекомбинантных способов с помощью синтетического линкера, который позволяет получать их в виде единой белковой цепи, в которой V_L- и V_H-области образуют пару с формированием моновалентных молекул, известных как одноцепочечный Fv (scFv). См., например, Bird, et al. (1988) *Science* 242: 423-426; Huston, et al. (1988) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883; и Osbourn, et al. (1998) *Nat. Biotechnol*. 16: 778. Подразумевается, что такие одноцепочечные антитела также охватываются термином «антигенсвязывающий участок» антитела. Любые последовательности V_H и V_L определенного scFv могут быть связаны с кДНК константной области человеческого иммуноглобулина или геномными последовательностями, чтобы генерировать векторы экспрессии, кодирующие полные молекулы IgG или другие изотипы. V_H и V_L также могут быть использованы при получении Fab, Fv или других фрагментов иммуноглобулинов с использованием химии белка или технологии рекомбинантных ДНК. Также охватываются другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела. Диатела представляют собой бивалентные биспецифические антитела, в которых VH- и VL-домены экспрессируются в одной полипептидной цепи, но с использованием линкера, который является слишком коротким, чтобы обеспечить возможность образования пары между двумя доменами одной цепи, что тем самым заставляет домены образовывать пару с комплементарными доменами другой цепи и приводит к созданию двух антигенсвязывающих участков. См., например, Holliger, et al. (1993) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448; Poljak, et al. (1994) *Structure 2*: 1121-1123. Более того, антитело или его антиген-связывающая часть могут составлять часть более крупных молекул иммунной адгезии (антигенсвязывающий фрагмент, фрагмент антитела, участок антитела), образованных с помощью ковалентной или нековалентной ассоциации антитела или части антитела с одним или несколькими другими белками или пептидами. Примеры таких молекул иммунной адгезии включают применение коровой области стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov, et al. (1995) *Hum. Antibodies Hybridomas* 6: 93-101) и применение цистеинового остатка, маркерного пептида и С-концевой полигистидиновой метки для получения бивалентных и биотинилированных молекул scFv. Kipriyanov, et al.

(1994) *Mol. Immunol.* 31: 1047-1058. Участки антител, такие как Fab- и F(ab')2-фрагменты, можно получать из целого антитела с применением традиционных методик, таких как переваривание целых антител папаином или пепсином, соответственно. Более того, антитела, части антитела и молекулы иммунной адгезии можно получать с применением стандартных методик рекомбинантной ДНК, описываемых в данном документе. Антитела могут быть поликлональными, моноклональными, ксеногенными, аллогенными, сингенными или их модифицированными формами, например гуманизированными, химерными, биспецифичными или мультиспецифичными антителами.

[428] Термин «тяжелая цепь антитела», как используется в данном документе, относится к большему из двух типов полипептидных цепей, присутствующих во всех молекулах антитела в их естественных конформациях.

[429] Термин «легкая цепь антитела», как используется в данном документе, относится к меньшему из двух типов полипептидных цепей, присутствующих во всех молекулах антитела в их естественных конформациях. Каппа- и лямбда-легкие цепи относятся к двум основным изотипам легкой цепи антитела. Под термином «синтетическое антитело», используемым в данном документе, подразумевается антитело, которое генерируется с использованием технологии рекомбинантной ДНК, такое как, например, антитело, экспрессируемое бактериофагом, как описано в данном документе. Термин также следует понимать как означающий антитело, которое было сгенерировано синтезом молекулы ДНК, кодирующей антитело, и какая молекула ДНК экспрессирует белок антитела, или аминокислотную последовательность, определяющую антитело, где последовательность ДНК или аминокислоты были получены с использованием технологии синтетической ДНК или аминокислотной последовательности, которая доступна и хорошо известна в данной области техники.

[430] Термин «антиген» или «Ag» относится к молекуле, которая вызывает иммунный ответ, например, аутоантиген в случае (гуморального) аутоиммунитета или аллоантиген в случае трансплантата или аллерген в случае аллергического патологического состояния. Этот иммунный ответ может включать либо продуцирование антител, либо активацию специфических иммунологически компетентных клеток, или то и другое. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить антигеном. Кроме того, антигены могут быть получены из

рекомбинантной или геномной ДНК. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидные последовательности или частичную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, тем самым кодирует «антиген», как этот термин используется в данном документе. Кроме того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген не должен кодироваться исключительно нуклеотидной последовательностью гена полной длины. Очевидно, что данное изобретение включает, но не ограничиваясь ими, использование частичных нуклеотидных последовательностей более чем одного гена и что эти нуклеотидные последовательности расположены в различных комбинациях для кодирования полипептидов, которые вызывают необходимый иммунный ответ. Кроме того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген вообще не должен кодироваться «геном». Очевидно, что антиген может быть сгенерирован, синтезирован или может быть получен из биологического образца или может представлять собой макромолекулу, помимо полипептида. Такой биологический образец может включать, но не ограничиваясь ими, образец ткани, образец опухоли, клетку или жидкость с другими биологическими компонентами. В одном аспекте антиген представляет собой MCT1.

[431] Термин «аутоиммунное заболевание» или «аутоиммунное заболевание или патологическое состояние», как он используется в данном документе, в широком смысле относится к заболеванию или расстройству, возникающему и направленному против собственных тканей индивидуума или косегрегации, или их проявлению, или к возникающему из них патологическому состоянию. В данном документе аутоиммунные патологические состояния включают воспалительные или аллергические патологические состояния, например, хронические заболевания, характеризующиеся иммунной реакцией хозяина против аутоантигенов, потенциально связанных с разрушением тканей, такие как ревматоидный артрит.

[432] Термин «аутологический» относится к любому материалу, полученному от того же самого человека, которому он позднее будет повторно введен.

[433] «AZ3965» используется в данном документе для общего обозначения AZ3965 и его аналогов с одинаковой аффинностью связывания, селективностью PK и MCT1/2. (**ссылка 50**)

[434] Термин «связывание» относится к притягательному взаимодействию между двумя молекулами, которое приводит к устойчивой ассоциации, в которой молекулы находятся в непосредственной близости друг от друга. Результатом молекулярного связывания иногда является образование молекулярного комплекса, в котором силы притяжения, удерживающие компоненты вместе, обычно нековалентны и, таким образом, обычно энергетически слабее, чем ковалентные связи.

[435] Используемый в данном документе термин «рак» в широком смысле относится к любому опухолевому заболеванию (инвазивному или метастатическому), характеризующемуся аномальным и неконтролируемым делением клеток, вызывающим злокачественный рост или опухоль (например, нерегулируемый рост клеток). Термин «рак» или «раковый», используемый в данном документе, следует понимать как охватывающий любое опухолевое заболевание (будь то инвазивное, неинвазивное или метастатическое), которое характеризуется аномальным и неконтролируемым делением клеток, вызывающим злокачественный рост или опухоль, неограничивающие примеры которых описаны в данном документе. Это включает любое физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры таких видов рака включают плоскоклеточный рак, рак легкого (включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточный рак легкого), рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудка (включая рак желудочно-кишечного тракта), рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия или матки, рак слюнной железы, рак почки, рак печени, рак предстательной железы, рак влагалища, рак щитовидной железы, гепатокарциному и различные виды рака головы и шеи, а также В-клеточную лимфому (в том числе с низкой степенью злокачественности/фолликулярную неходжкинскую лимфому (NHL); малую лимфоцитарную (SL) NHL; с промежуточной степенью злокачественности/фолликулярную NHL; диффузную NHL с промежуточным уровнем злокачественности; иммунобластную NHL с высоким уровнем злокачественности; лимфобластную NHL с высоким уровнем злокачественности; мелкоклеточную NHL с нерассеченными ядрами с высоким

уровнем злокачественности; генерализованную NHL; мантийноклеточную лимфому; СПИД-связанную лимфому; и макроглобулинемию Вальденстрема); хронический лимфолейкоз (CLL); острый лимфобластный лейкоз (ALL); волосатоклеточный лейкоз; хронический миелобластный лейкоз; множественную миелому и посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство (PTLD). Другие виды рака, которые можно лечить с помощью данного изобретения, включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфоидные злокачественные новообразования. Раковые состояния, поддающиеся лечению по данному изобретению, включают виды рака, которые экспрессируют MCT1.

[436] «Область, определяющая комплементарность», «гипервариабельная область» или «CDR», как используется в данном документе, в широком смысле относится к одной или нескольким гипервариабельным или комплементарно определяющим областям (CDR), обнаруженным в вариабельных областях легких или тяжелых цепей антитела. См., Kabat, et al. (1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest National Institutes of Health*, Bethesda, Md. Эти выражения включают гипервариабельные области, как определено Kabat, et al. (1983) Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Dept. of Health and Human Services or the hypervariable loops in 3-dimensional structures of antibodies. Chothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917. CDR в каждой цепи удерживаются в непосредственной близости посредством каркасных областей и, вместе с CDR из другой цепи, участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта. Внутри CDR имеются выбранные аминокислоты, которые были описаны как области, определяющие селективность (SDR), которые представляют собой критические контактные остатки, используемые CDR во взаимодействии антитело-антиген. (Kashmiri *Methods* 36: 25-34(2005)).

[437] Термин «конкурировать», используемый в данном документе в отношении антитела, означает, что первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (или часть) связывается с эпитопом способом, достаточно сходным со связыванием второго антитела или его антигенсвязывающего участка, так что результат связывания первого антитела с его исходным эпитопом заметно уменьшается в присутствии второго антитела по сравнению со связыванием первого антитела в отсутствие второго антитела. Альтернатива, где связывание второго антитела с его эпитопом также заметно снижается в присутствии первого

антитела, может, но не обязательно, иметь место. Т.е., первое антитело может ингибировать связывание второго антитела с его эпитопом без того, чтобы указанное второе антитело ингибировало связывание первого антитела с его соответствующим эпитопом. Однако в тех случаях, когда каждое антитело обнаруживаемым образом ингибирует связывание другого антитела с его когнатным эпитопом или лигандом, в одинаковой, большей или меньшей степени антитела считаются «перекрестно конкурирующими» друг с другом для связывания их соответствующего (соответствующих) эпитопа (эпитопов). Как конкурирующие, так и перекрестно конкурирующие антитела охватываются данным изобретением. Независимо от механизма, посредством которого происходит такая конкуренция или перекрестная конкуренция (например, стерическое затруднение, конформационное изменение или связывание с общим эпитопом или его частью), специалисту в данной области техники будет понятно, основываясь на представленных в данном документе идеях, что такая конкурирующие и/или перекрестно конкурирующие антитела охватываются и могут быть пригодны для способов, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело по данному изобретению может конкурировать или перекрестно конкурировать с Ат1 к MCT1 за связывание с MCT1.

[438] В данной области техники известно, что термины «область, определяющая комплементарность» и «CDR», синонимичные «гипервариабельной области» или «HVR», относятся к несмежным последовательностям аминокислот в вариабельных областях антитела, которые придают антигенную специфичность и/или аффинность связывания. Как правило, в каждой вариабельной области легкой цепи имеется три CDR (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждой вариабельной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Известно, что «каркасные области» и «FR» относятся к не относящимся к CDR участкам вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. Как правило, в каждой полноразмерной вариабельной области тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4) имеется четыре FR в каждой полноразмерной вариабельной области легкой цепи (FR- L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4).

[439] Термин «цитокины» относится к широкой категории небольших белков, которые участвуют в передаче сигналов клетки. Как правило, их высвобождение оказывает некоторое влияние на поведение клеток вокруг них. Цитокины могут

быть вовлечены в аутокринную передачу сигналов, паракринную передачу сигналов и/или эндокринную передачу сигналов в качестве иммуномодулирующих агентов. Цитокины включают хемокины, интерфероны, интерлейкины, лимфокины и факторы некроза опухолей. Цитокины продуцируются широким спектром клеток, включая иммунные клетки, такие как макрофаги, В-лимфоциты, Т-лимфоциты и тучные клетки, а также эндотелиальные клетки, фибробласты и различные стромальные клетки. «Хемокины» представляют собой семейство цитокинов, обычно участвующих в опосредовании хемотаксиса.

[440] Фраза «заболевание, связанное с экспрессией MCT1» включает, но не ограничиваясь ими, заболевание, связанное с экспрессией MCT1, или патологическое состояние, ассоциированное с клетками, которые экспрессируют MCT1, включая, например, аутоиммунные заболевания, такие как системная красная волчанка; или раковые или не относящиеся к раку признаки, ассоциированные с клетками, которые экспрессируют MCT1.

[441] Используемый в данном документе термин «EC_{50}» относится к дозе тестируемого соединения, например, анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который приводит к 50% его максимального ответа или эффекта в анализе.

[442] «Эффективное количество» или «количество, эффективное для лечения» относится к дозе, которая является адекватной для предупреждения или лечения заболевания, патологического состояния или расстройства у индивидуума. Количества, эффективные для терапевтического или профилактического применения, будут зависеть, например, от стадии и тяжести заболевания или расстройства, подвергаемого лечению, возраста, веса и общего состояния здоровья пациента, а также от оценки лечащего врача. Размер дозы также будет определяться выбранным активным веществом, способов введения, сроками и частотой введения, наличием, характером и степенью любых неблагоприятных побочных эффектов, которые могут сопровождать введение конкретного активного вещества, и необходимым физиологическим эффектом. Специалисту в данной области техники будет понятно, что различные заболевания или расстройства могут требовать длительного лечения, включающего многократные введения, возможно, с использованием антител по данному изобретению в каждом или различных циклах введения.

[443] «Эпитоп» или «сайт связывания» представляет собой участок или область на антигене, с которой специфически связывается антигенсвязывающий пептид (такой как антитело). Эпитоп белка может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании (также называемые иммунодоминантным компонентом эпитопа), и другие аминокислотные остатки, которые непосредственно не участвуют в связывании, такие как аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются специфическим антигенсвязывающим пептидом (другими словами, аминокислотный остаток находится в пределах «отпечатка» специфического антигенсвязывающегося пептида). Термин эпитоп в данном документе включает оба типа сайтов связывания аминокислот в любой конкретной области MCT1, которая специфически связывается с анти-MCT1 антителом. MCT1 может содержать ряд различных эпитопов, которые могут включать, но не ограничиваясь ими, (1) линейные пептидные антигенные детерминанты, (2) конформационные антигенные детерминанты, которые состоят из одной или нескольких несмежных аминокислот, расположенных рядом друг с другом в зрелой конформации MCT1; и (3) посттрансляционные антигенные детерминанты, которые состоят, полностью или частично, из молекулярных структур, ковалентно связанных с белком MCT1, таких как углеводные группы. В частности, термин «эпитоп» включает специфические остатки в белке или пептиде, например MCT1, которые участвуют в связывании антитела с таким белком или пептидом, что определяется известными и общепринятыми способами, такими как методики сканирования аланином. Такие способы иллюстрируются в данном документе.

[444] «Экспрессирующий вектор» в данном документе относится к ДНК-векторам, содержащим элементы, которые облегчают манипулирование экспрессией чужеродного белка в клетке-хозяине, например клетке бактерии, насекомого, дрожжевого гриба, растения, амфибии, рептилии, птицы или млекопитающего, и наиболее типично клетке дрожжей или млекопитающих, например клетке CHO. Удобно, чтобы манипулирование последовательностями и продуцированием ДНК для трансформации сначала выполняли в бактериальном хозяине, например, E. coli, и обычно векторы будут включать последовательности для облегчения таких манипуляций, включая бактериальный источник репликации и соответствующий маркер бактериальной селекции. Селекционные маркеры кодируют белки, необходимые для выживания или роста трансформированных клеток-хозяев, выращенных в селективной культуральной среде. Клетки-хозяева,

не трансформированные вектором, содержащим селективный ген, не выживают в культуральной среде. Типичные селективные гены кодируют белки, которые (a) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, (b) дополняют ауксотрофные недостасточности или (в) поставляют критические питательные вещества, недоступные из сложных сред. Иллюстративные векторы и способы трансформации дрожжей описаны, например, в Burke, D., Dawson, D., & Stearns, T., Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual, Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000). Экспрессионные векторы для использования в способах по данному изобретению могут включать специфические последовательности дрожжевых грибов или млекопитающих, включая селектируемый ауксотрофный или лекарственный маркер для идентификации трансформированных штаммов-хозяев. Лекарственный маркер может дополнительно использоваться для амплификации числа копий вектора в дрожжевой клетке-хозяине.

[445] Термины «экспрессировать» и «продуцировать» используются в данном документе как синонимы и относятся к биосинтезу продукта гена. Указанные термины охватывают транскрипцию гена в РНК. Указанные термины также охватывают трансляцию РНК в один или несколько полипептидов и, кроме того, охватывают все встречающиеся в природе посттранскрипционные и посттрансляционные модификации. Экспрессия/продуцирование антитела или антигенсвязывающего фрагмента может происходить в цитоплазме клетки и/или во внеклеточной среде, такой как среда для роста клеточной культуры.

[446] Термины «Fc-рецептор» и «FcR» описывают рецептор, который связывается с Fc-областью антитела. Предпочтительным FcR является FcR человека с нативной последовательностью. Кроме того, предпочтительным FcR является тот, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы указанных рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют аналогичные аминокислотные последовательности, которые отличаются, главным образом, их цитоплазматическими доменами. FcR рассматриваются в Ravetch and Kinet, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods, 4:25-34 (1994); и de Haas et al, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). «FcR» также включает неонатальный рецептор FcRn, который отвечает за

перенос материнских IgG к плоду (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117: 587 (1976); и Kim et al., *J. Immunol.*, 24: 249 (1994)), и который в основном функционирует для модуляции и/или продления периода полужизни антител в кровотоке. В той степени, в которой раскрытые анти-MCT1 антитела являются агликозилированными в результате экспрессионной системы и/или последовательности, ожидается, что рассматриваемые антитела связывают рецепторы FcRn, но не связывают (или минимально связывают) рецепторы Fcγ.

[447] Термин «Fc-область» используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина. «Fc-область» может представлять собой Fc-область с нативной последовательностью или вариантную Fc-область. Несмотря на то, что границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно определяется как отрезок от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до его карбоксильного конца. Нумерация остатков в Fc-области соответствует нумерации индекса EC по Кабату. Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th edition, Bethesda, MD: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health (1991). Fc-область иммуноглобулина, как правило, содержит два константных домена, CH2 и CH3.

[448] Выражения «каркасная область» или «FR» относятся к одной или нескольким каркасным областям в пределах вариабельных областей легкой и тяжелой цепей антитела (см. Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4th edition, Bethesda, MD: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health (1987)). Эти выражения включают области аминокислотной последовательности, расположенные между CDR в вариабельных областях легкой и тяжелой цепей антитела.

[449] «Функциональная Fc-область» обладает, по меньшей мере, одной эффекторной функцией Fc-области с нативной последовательностью. Иллюстративные «эффекторные функции» включают связывание C1q; комплемент-зависимую цитотоксичность («CDC»); связывание с Fc-рецептором; антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность («ADCC»); фагоцитоз; подавление рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора («BCR»)) и т.д. Такие эффекторные функции, как правило, требуют объединения Fc-области со связывающим доменом (например, вариабельным доменом антитела) и могут быть оценены с использованием

различных анализов, известных в данной области техники для оценки таких эффекторных функций антител. «Fc-область с нативной последовательностью» включает аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-области, встречающейся в природе. «Вариантная Fc-область» содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности Fc-области с нативной последовательностью благодаря, по меньшей мере, одной модификации аминокислоты, но при этом сохраняет, по меньшей мере, одну эффекторную функцию Fc-области с нативной последовательностью. Предпочтительно вариантная Fc-область имеет, по меньшей мере, одну аминокислотную замену по сравнению с Fc-областью с нативной последовательностью или с Fc-областью исходного полипептида, например, от примерно одной до примерно десяти аминокислотных замен и, например, от примерно одной до примерно пяти аминокислотных замен в Fc-области с нативной последовательностью или в Fc-области исходного полипептида. Вариантная Fc-область в данном документе, например, будет обладать, по меньшей мере, около 80% идентичностью последовательности по отношению к Fc-области с нативной последовательностью и/или с Fc-областью исходного полипептида и, например, в большинстве случаев, по меньшей мере, около 90% идентичностью последовательности с ней, более предпочтительно, например, по меньшей мере, около 95%, по меньшей мере, около 96%, по меньшей мере, около 97%, по меньшей мере, около 98% или, по меньшей мере, около 99% идентичностью последовательности по отношению к ним.

[450] «Заболевание трансплантат против хозяина» (GVHD): в контексте данного описания относится к общему осложнению аллогенной трансплантации костного мозга или трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, при котором функциональные иммунные клетки в трансплантированном костном мозге распознают реципиента как «чужеродные» и вызывают иммунный ответ на ткань хозяина. В соответствии с критериями Биллингема 1959 года, для возникновения GVHD должны быть соблюдены три критерия: 1) введение иммунокомпетентного трансплантата с жизнеспособными и функциональными иммунными клетками; 2) реципиент является иммунологически гистонесовместимым; 3) реципиент имеет ослабленный иммунитет и поэтому не может разрушать или инактивировать трансплантированные клетки. Клинически заболевание «трансплантат против хозяина» делится на острую и хроническую формы. Острая или молниеносная форма заболевания (aGVHD) обычно наблюдается в течение первых 100 дней

после трансплантации и представляет собой серьезную проблему для эффективности трансплантации вследствие связанной с этим заболеваемости и смертности. Хроническая форма заболевания «трансплантат против хозяина» (cGVHD) обычно возникает через 100 дней. Появление случаев cGVHD от умеренной до тяжелой степени неблагоприятно влияет на долговременную выживаемость. После трансплантации костного мозга Т-клетки, присутствующие в трансплантате либо в виде контаминантов, либо преднамеренно введенные в организм хозяина, атакуют ткани реципиента трансплантата после того, как воспринимают ткани хозяина как антигенно чужеродные. Т-клетки продуцируют избыток цитокинов, включая ФНОα и интерферон-гамма (ИФНγ). Широкий спектр антигенов хозяина может инициировать заболевание трансплантат против хозяина, среди них лейкоцитарные антигены человека (HLA). Тем не менее, заболевание «трансплантат против хозяина» может возникать, даже если HLA-идентичные сибсы являются донорами. Классически острое заболевание трансплантат против хозяина характеризуется избирательным повреждением печени, кожи и слизистой оболочки, а также желудочно-кишечного тракта. Дополнительные исследования показывают, что заболевание «трансплантат против хозяина» нацелено на органы, включая иммунную систему (например, костный мозг и тимус), а также легкие в форме идиопатического пневмонита. Хроническая заболевание «трансплантат против хозяина» также поражает вышеперечисленные органы, но в течение длительного времени может также приводить к повреждению соединительной ткани и экзокринных желез.

[451] Термин «клетка-хозяин», используемая в данном документе, в широком смысле относится к клетке, в которую была введена молекула нуклеиновой кислоты по данному изобретению, такая как рекомбинантный экспрессионный вектор по данному изобретению. Клетки-хозяева могут быть прокариотическими клетками (например, E. coli) или эукариотическими клетками, такими как клетки дрожжевых грибов, насекомых (например, SF9), амфибий или клетками млекопитающих, такими как CHO, HeLa, HEK-293, например, культивируемыми клетками, эксплантами и клетки *in vivo*. Термины «клетка-хозяин» и «рекомбинантная клетка-хозяин» используются в данном документе взаимозаменяемо. Следует понимать, что такие термины подразумеваются для обозначения не только конкретной подвергнутой воздействию клетки, но и потомства такой клетки. Поскольку определенные изменения могут произойти в последующих поколениях из-за мутации или воздействия или влияния

окружающей среды, потомство может фактически не совпадать с родительской клеткой, но все еще быть включено в объем термина, как он используется в данном документе.

[452] Используемый в данном документе термин «человеческое антитело» означает антитело, имеющее аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, продуцируемого человеком, и/или которое было получено с использованием любой из методик получения антител человека, известных специалистам в данной области техники, или раскрытых в данном документе. Это определение человеческого антитела включает антитела, содержащие, по меньшей мере, один полипептид тяжелой цепи человека или, по меньшей мере, один полипептид легкой цепи человека. Одним из таких примеров является антитело, содержащее легкую цепь мыши и полипептиды тяжелой цепи человека. Человеческие антитела можно получать при помощи различных методик, известных в данной области техники. В одном варианте осуществления человеческое антитело выбирают из фаговой библиотеки, причем эта фаговая библиотека экспрессирует человеческие антитела (Vaughan et al., *Nature Biotechnology*, 14:309-314, 1996; Sheets et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (USA) 95:6157-6162, 1998; Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381, 1991; Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581, 1991). Человеческие антитела также могут быть получены путем иммунизации животных, которым локусы иммуноглобулина человека были трансгенно введены вместо эндогенных локусов, например, мышей, у которых гены эндогенного иммуноглобулина были частично или полностью инактивированы. Указанный подход описывается в патентах США №№ 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425 и 5661016. В качестве альтернативы, человеческое антитело может быть получено путем иммортализации В-лимфоцитов человека, которые продуцируют антитело, направленное против целевого антигена (такие В-лимфоциты могут быть выделены из индивидуума или в результате клонирования одной клетки кДНК или могут быть иммунизированы *in vitro*). См., например, Cole et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77, 1985; Boerner et al., *J. Immunol.*, 147 (1):86-95, 1991; и патенты США №№ 5750373.

[453] «Человеческое моноклональное антитело» относится к антителам, обладающим единственной специфичностью связывания, которые имеют вариабельные области, в которых как каркасные области, так и области CDR

получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. В одном варианте осуществления человеческие моноклональные антитела продуцируются гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного не относящегося к человеку животного, например, трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи, слитый с иммортализованной клеткой. Это включает полностью человеческие моноклональные антитела и конъюгаты и их варианты, например, которые связаны с эффекторными агентами, такими как терапевтические или диагностические агенты.

[454] «Гуманизированное антитело», как используется в данном документе, в широком смысле включает антитела, полученные из не относящейся к человеку клетки, имеющей вариабельные и константные области, которые были изменены, чтобы более близко быть похожими на антитела, которые были бы созданы человеческой клеткой. Например, путем изменения не относящейся к человеку аминокислотной последовательности антитела, для включения аминокислот, обнаруженных в последовательностях иммуноглобулина зародышевой линии человека. Гуманизированные антитела по данному изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые в последовательностях иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или с помощью соматического мутагенеза *in vivo*), например, в CDR. Термин «гуманизированное антитело», используемый в данном документе, включает антитела, в которых последовательности CDR, происходящие из последовательностей зародышевого линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты на последовательности каркасных областей человека. Используемый в данном документе термин «гуманизированное антитело» также включает в себя аффинно-зрелые антитела, которые являются как гуманизированными, так и аффинно-зрелыми, например, для усиления связывания антитела с MCT1 или другим целевым антигеном.

[455] Используемый в данном документе термин «IC_{50}» относится к дозе тестируемого соединения, например анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которая приводит к 50% ингибированию в биохимическом анализе.

[456] «Воспалительные расстройства», «воспалительные патологические состояния» и/или «воспаление», используемые в данном документе взаимозаменяемо, в широком смысле относятся к хроническим или острым воспалительным заболеваниям и явно включают воспалительные аутоиммунные заболевания и воспалительные аллергические патологические состояния. Эти состояния включают в качестве примера воспалительные нарушения, характеризующиеся нарушенной иммунной реакцией на вредные раздражители, такие как патогены, поврежденные клетки или раздражители. Воспалительные расстройства лежат в основе широкого спектра заболеваний человека. Неиммунные заболевания с этиологическим происхождением в воспалительных процессах включают рак, атеросклероз и ишемическую болезнь сердца. Примеры расстройств, связанных с воспалением, включают в себя: хронический простатит, гломерулонефрит, гиперчувствительность, воспаление тазовых органов, реперфузионное повреждение, саркоидоз, васкулит, интерстициальный цистит, нормокомплементемный уртикариальный васкулит, перикардит, миозит, антисинтетазный синдром, склерит, синдром бета-синдрома, синдром антисинтетического синдрома, синдром активации макрофагов, синдром Бехчета, синдром Блау, подагры, болезнь Стилла у взрослых и подростков, криопиринопатию, синдром Макла-Уэллса, семейный аутовоспалительный синдром, вызванный холодом, мультисистемное воспалительное заболевание у новорожденных, семейную средиземноморсккую лихорадку, хронический детский неврологический, кожный и суставной синдром, системный ювенильный идиопатический артрит, синдром гипер-IgD, синдром Шницлера, периодический синдром, ассоциированный с рецептором ФНО (TRAPSP), гингивит, периодонтит, гепатит, цирроз, панкреатит, миокардит, васкулит, гастрит, подагру, подагрический артрит и воспалительные кожные заболевания, выбранные из группы, состоящей из псориаза, атопического дерматита, экземы, розацеа, крапивницы и акне.

[457] Используемый в данном документе термин «ингибитор» относится к соединению, которое связывается с мишенью и делает ее биологически неактивной или менее активной. В конкретном варианте осуществления соединение представляет собой анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий эффект соединения измеряют посредством ингибирования MCT1-опосредованного транспорта лактата.

[458] «Выделенный» биологический компонент (такой как выделенное антитело или клетка, или вектор, или белок, или нуклеиновая кислота) относится к компоненту, который по сути отделен или очищен от окружающей среды или других биологических компонентов в клетке организма, в которой компонент естественным образом встречается, например, в других хромосомных и внехромосомных ДНК и РНК, белках и органеллах. Нуклеиновые кислоты и белки, которые были «выделены», включают нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными способами очистки. Термин также охватывает нуклеиновые кислоты и белки, полученные с помощью рекомбинантной технологии, а также химического синтеза. Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать по сути в очищенной форме или могут существовать в ненативной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

[459] Подразумевается, что используемое в данном документе выражение «выделенное антитело» относится к антителу, которое по сути не содержит других антител с иной антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывает MCT1, по сути не содержит антител, которые специфически связывают антигены, отличные от MCT1). Более того, выделенное антитело может практически не содержать других клеточных материалов и/или химических веществ.

[460] Термин «метка» или «обнаруживаемый фрагмент», используемый в данном документе, относится к композиции, обнаруживаемой с помощью спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических, химических или других физических средств.

[461] Предполагается, что термин «волчанка» включает все типы волчанки. Существует 4 типа волчанки, которые обсуждаются ниже. Предполагается, что «волчаночноподобное состояние» включает воспалительные патологические состояния с симптомами, аналогичными системной красной волчанке, такими как воспаление почек, усиленная протеинурия и спленомегалия. «Системная красная волчанка» или («SLE»), наиболее распространенная форма волчанки, может быть легкой или тяжелой и может поражать основные системы органов. Это патологическое состояние, которое большинство людей ассоциируют с «волчанкой». Это аутоиммунное состояние неизвестной этиологии, которое может привести к воспалению почек, называемому волчаночным нефритом, которое может повлиять на способность организма отфильтровывать отходы из крови,

или, если оно тяжелое, может привести к повреждению почек, требующему диализа или трансплантации почки. Также SLE может привести к повышению артериального давления в легких, так называемой легочной гипертензии, что может вызвать затруднение дыхания. Кроме того, SLE может вызывать воспаление нервной системы и мозга, что может вызывать проблемы с памятью, спутанность сознания, головные боли и инсульты. Кроме того, SLE может приводить к воспалению в кровеносных сосудах головного головного мозга, что может вызвать высокую температуру, судороги и поведенческие изменения. Также SLE может приводить к затвердению артерий или заболеванию коронарной артерии, а именно накоплению отложений на стенках коронарной артерии, что может приводить к сердечному приступу. «Волчанка кожи» в данном документе относится к состояниям волчанки, которые влияют только на кожу. Существует три типа волчанки, которые влияют на кожную хроническую красную волчанку (CCLE) (также известную как дискоидная красная волчанка [DLE]), подострую кожную красную волчанку (SCLE) и отечную волчанку. Кожная красная волчанка или дискоидная красная волчанка может вызывать многие виды сыпи и поражений (язв), наиболее часто называемая дискоидной сыпью, является возвышающейся, чешуйчатой и красной, но не зудящей. Области сыпи появляются в виде дисков или кругов. Другим распространенным примером кожной волчанки является сыпь на щеках и на переносице, известная как сыпь бабочки. Другие высыпания или язвы могут появиться на лице, шее или коже головы (участки кожи, которые подвергаются воздействию солнечного света или флуоресцентного света) или во рту, носу или влагалище. Выпадение волос и изменения пигмента или цвета кожи также являются симптомами кожной волчанки. Приблизительно у 10 процентов людей с кожной волчанкой развивается системная красная волчанка. Однако, вероятно, что у этих людей уже была системная красная волчанка, с кожной сыпью в качестве основного симптома. «Лекарственная красная волчанка» представляет собой патологическое состояние, вызываемое определенными лекарственными средствами, которые могут вызывать симптомы, подобные волчанке, у людей, у которых нет SLE. Как правило, эта форма волчанки носит временный характер и обычно проходит в течение нескольких месяцев после прекращения приема лекарственных препаратов. Известно, что лекарственные средства, вызывающие симптомы, подобные волчанке, включают препараты для лечения кровяного давления, гидралазин и метилдопу, сердечный препарат под названием прокаинамид и препарат под названием D-пеницилламин, который

используется в случаях отравления металлами. Другие причины лекарственной волчанки включают миноциклин (используется для лечения угрей), изониазид, средство от туберкулеза, и анти-ФНО (используется для лечения ревматоидного артрита). Симптомы лекарственной волчанки сходны с симптомами системной волчанки, но в отличие от SLE, редко поражают основные органы. Волчанка новорожденных не является истинной формой волчанки. Это редкое заболевание, которое поражает детей, страдающих волчанкой, и вызвано антителами матери, действующими на ребенка в утробе матери. При рождении ребенок может иметь кожную сыпь, проблемы с печенью или сниженное количество клеток крови, но эти симптомы обычно полностью исчезают через несколько месяцев без каких-либо продолжительных эффектов. У некоторых детей с волчанкой новорожденных также может быть серьезный порок сердца.

[462] «MCT1» представляет собой протонно-связанный транспортер монокарбоксилата. MCT1 представляет собой многоходовой трансмембранный белок, ответственный за облегченный транспорт критических метаболитов, в том числе продуктов гликолиза. Он катализирует быстрый перенос через плазматическую мембрану многих монокарбоксилатов, таких как лактат, пируват, оксокислоты с разветвленной цепью, полученные из лейцина, валина и изолейцина, и кетоновых тел, ацетоацетата, бета-гидроксибутирата и ацетата. В зависимости от ткани и обстоятельств, MCT1 обеспечивает импорт или экспорт молочной кислоты и кетоновых тел. MCT1 представляет собой члена одного из крупнейших семейств поверхностных мембранных белков, известных как белки-каналы растворенных веществ (SLC), в функции которых входит транспорт через мембраны критических клеточных питательных веществ, метаболитов, ионов, гормонов и липидов. MCT1 принадлежит к семейству транспортеров SLC16, пять из которых, как было показано, транспортируют монокарбоксилаты, такие как пируват, лактат и кетоны облегченным pH-зависимым и двунаправленным образом. MCT1 также может называться любым из следующих названий: транспортер монокарбоксилата 1, SLC16A1, HHF7, MCT, MCT1, MCT1D, член 1 семейства растворенных носителей 16. У людей он кодируется геном SLC16A1.

[463] «MCT2» представляет собой протонно-связанный транспортер монокарбоксилата. Он катализирует быстрый перенос через плазматическую мембрану многих монокарбоксилатов, таких как лактат, пируват, оксокислоты с разветвленной цепью, полученные из лейцина, валина и изолейцина, и кетоновых

тел, ацетоацетата, бета-гидроксибутирата и ацетата. Он также функционирует как высокоаффинный переносчик пирувата. MCT2 также может называться любым из следующих названий: транспортер монокарбоксилата 2, SLC16A7, MCT2, член 7 семейства растворенных носителей 16. У людей он кодируется геном *SLC16A7*.

[464] «MCT3» представляет собой протонно-связанный транспортер монокарбоксилата. Он катализирует быстрый перенос через плазматическую мембрану многих монокарбоксилатов, таких как лактат, пируват, оксокислоты с разветвленной цепью, полученные из лейцина, валина и изолейцина, и кетоновых тел, ацетоацетата, бета-гидроксибутирата и ацетата. Он также функционирует как высокоаффинный переносчик пирувата. Экспрессия MCT3 ограничена пигментным эпителием сетчатки и эпителием сосудистого сплетения, где он расположен на базальной мембране в отличие от MCT1, который находится на апикальной мембране. MCT3 также может называться любым из следующих названий: транспортер монокарбоксилата 3, SLC16A8, MCT3, REMP, член 8 семейства растворенных носителей 16. У людей он кодируется геном *SLC16A8*.

[465] «MCT4» представляет собой протонно-связанный монокарбоксилатный транспортер. MCT4 также может называться любым из следующих названий: транспортер монокарбоксилата 4, SLC16A3, MCT 3, MCT 4, MCT-3, MCT-4, MCT3, MCT4, член 3 семейства растворенных носителей 16. У людей он кодируется геном *SLC16A3*.

[466] «Мультиспецифическое антитело» или «мультиспецифический антигенсвязывающий белок» относится к полипептиду или антителу с 2 или более антигенсвязывающими областями. Это включает в себя биспецифичные антитела. Эти антигенсвязывающие области могут связываться с разными антигенами или с разными эпитопами одного и того же антигена.

[467] Термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» относятся к РНК или ДНК, которая является линейной или разветвленной, одноцепочечной или двухцепочечной или их гибридом. Термин также охватывает гибриды РНК/ДНК. Ниже приведены неограничивающие примеры полинуклеотидов: ген или фрагмент гена, экзоны, интроны, мРНК, тРНК, рРНК, рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК из любой последовательности, выделенная РНК из любой последовательности. последовательности, зонды нуклеиновых кислот и праймеры. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды,

такие как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов, урацил, другие сахара и связывающие группы, такие как фторибоза и тиолат, и ветви нуклеотидов. Последовательность нуклеотидов может быть дополнительно модифицирована после полимеризации, такой как конъюгация, метящим компонентом. Другими типами модификаций, включенными в это определение, являются кэпы, замена одного или нескольких встречающихся в природе нуклеотидов аналогом и введение средств для присоединения полинуклеотида к белкам, ионам металлов, метящим компонентам, другим полинуклеотидам или твердой подложке. Полинуклеотиды могут быть получены с помощью химического синтеза или происходить из микроорганизма. Термин «ген» широко используется для обозначения любого сегмента полинуклеотида, ассоциированного с биологической функцией. Таким образом, гены включают интроны и экзоны, как в геномной последовательности, или только кодирующие последовательности, как в кДНК, и/или регуляторные последовательности, необходимые для их экспрессии. Например, ген также относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который экспрессирует мРНК или функциональную РНК или кодирует конкретный белок и который включает регуляторные последовательности.

[468] Нуклеиновые кислоты «функционально связаны», когда находятся в функциональном отношении с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК для сигнальной последовательности функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в виде белка-предшественника, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности. Как правило, «функционально связанный» означает, что последовательности ДНК, являющиеся связанными, являются смежными и, в случае секреторного лидера, смежными и находятся в рамке считывания. В то же время энхансеры не должны быть смежными. Связывание осуществляют путем лигирования в подходящих сайтах рестрикции или, в качестве альтернативы с помощью метода ПЦР/рекомбинации, известного специалистам в данной области техники (технология GATEWAY11; Invitrogen, Карлсбад, Калифорния). Если такие сайты не существуют, синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры используются в соответствии с общепринятой практикой.

[469] Термин «фармацевтически приемлемый носитель» или «наполнитель» относится к соединениям или материалам, обычно используемым в фармацевтических композициях во время составления и/или для обеспечения хранения.

[470] Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и в широком смысле относятся к полимеру из аминокислотных остатков любой длины, независимо от модификации (например, фосфорилирования или гликозилирования). Термины применяют в отношении полимеров аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков являются аналогом или миметиком соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также встречающихся в природе полимеров. Термины применяют в отношении полимеров аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков являются искусственным химическим миметиком соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также встречающихся в природе полимеров аминокислот и не встречающегося в природе полимера аминокислот. Полипептиды могут быть модифицированы, например, путем добавления углеводных остатков с образованием гликопротеинов. Термины «полипептид», «пептид» и «белок» явно включают гликопротеины, а также не относящиеся к гликопротеинами соединения.

[471] Используемый в данном документе термин «промотор» определяется как последовательность ДНК, распознаваемая синтетическим механизмом клетки, или введенным синтетическим механизмом, необходимым для инициирования специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности.

[472] «Профилактически эффективное количество», как используется в данном документе, в широком смысле относится к количеству соединения, которое при введении пациенту для профилактики заболевания или предупреждения рецидива заболевания является достаточным для осуществления такой профилактики заболевания или рецидива. Профилактически эффективное количество может представлять собой количество, эффективное для предупреждения появления признаков и/или симптомов. «Профилактически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от заболевания и его тяжести, а также от возраста, веса, истории болезни, предрасположенности к патологическим условиям, предшествующим патологическим состояниям пациента, подлежащего лечению.

[473] Термин «рекомбинантный», используемый в данном документе, в широком смысле относится к продукту, например к клетке или нуклеиновой кислоте, белку или вектору, указывает на то, что клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор были модифицированы введением гетерологичной нуклеиновой кислоты или белка, или изменением нативной нуклеиновой кислоты или белка, или то, что клетка получена из клетки, модифицированной таким образом. Таким образом, например, рекомбинантные клетки экспрессируют гены, которые не обнаружены в нативной (нерекомбинантной) форме клетки, или экспрессируют нативные гены, которые иным образом аномально экспрессируются, недостаточно экспрессируются или вообще не экспрессируются.

[474] Термин «рекомбинантное человеческое антитело», как используется в данном документе, включает все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такими как (a) антитела, выделенные от животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным для генов иммуноглобулина человека или полученной из них гибридомы (описано далее ниже), (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии человеческого антитела, например, из трансфектомы, (c) антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют вариабельные области, в которых каркасные и CDR-области получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Однако в определенных вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека могут быть подвержены *in vitro* мутагенезу (или, при применении животного, трансгенного по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности V_H- и V_L-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и происходят из последовательностей V_H и V_L зародышевого типа человека и родственны им, могут не существовать сами по себе в пределах репертуара антител зародышевого типа человека *in vivo*.

[475] «Селектируемый маркер» в данном документе относится к гену или фрагменту гена, который придает фенотип роста (характеризация физического

роста) клетке, получающей этот ген, например, посредством трансформационного события. Селектируемый маркер позволяет этой клетке выживать и расти в селективной среде роста в условиях, при которых клетки, которые не получают этот селектируемый маркерный ген, не могут расти. Селектируемые маркерные гены обычно делятся на несколько типов, в том числе положительно селектируемые маркерные гены, такие как ген, который придает клеточную устойчивость к антибиотику или другому лекарственному средству, температуре, когда скрещиваются два чувствительных к температуре («ts») мутанта или трансформируется мутант ts; гены негативных селектируемых маркеров, такие как ген биосинтеза, который придает клетке способность расти в среде без определенного питательного вещества, необходимого для всех клеток, у которых нет этого гена биосинтеза, или мутагенизированный ген биосинтеза, который придает клетке неспособность расти клетками, которые не имеют гена дикого типа; и т.п. Подходящие маркеры включают, но не ограничиваются ими: ZEO; G418; LYS3; MET1; MET3a; ADE1; ADE3; URA3; и т.п.

[476] «Субъект» или «пациент» или «индивидуум» в контексте терапии или диагноза в данном документе включают человека или не относящееся к человеку животное. Термин «не относящееся к человеку животное» включает всех позвоночных животных, например млекопитающих и не относящихся к млекопитающим организмов, таких как не относящиеся к человеку приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, цыплята, амфибии, рептилии и т.д., т.е. любой организм, подходящий для лечения в соответствии с данным изобретением, включает, но не ограничиваясь ими, субъектов-птиц и субъектов-млекопитающих и, например, млекопитающее. Подходящим является любой субъект-млекопитающее, нуждающийся в лечении в соответствии с данным изобретением. Субъекты-люди обоего пола и на любой стадии развития (т.е., новорожденные, младенцы, подростки, молодежь и взрослые) могут лечиться в соответствии с данным изобретением. Данное изобретение также может быть выполнено на субъектах-животных, в частности, млекопитающих, таких как мыши, крысы, собаки, кошки, крупный рогатый скот, козы, овцы и лошади, для ветеринарных целей, а также для скрининга и разработки лекарственных средств. «Субъекты» используются взаимозаменяемо с «индивидуумами» и «пациентами».

[477] Фраза о том, что антитело (например, первое антитело) связывается «по сути» или «по меньшей мере частично» с тем же эпитопом, что и другое антитело

(например, второе антитело), означает, что сайт связывания эпитопа для первого антитела содержит, по меньшей мере, 10% 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более аминокислотных остатков на антигене, который составляет сайт связывания эпитопа второго антитела. Кроме того, то, что первое антитело связывает по сути или частично тот же самый или перекрывающийся эпитоп, что и второе антитело, означает, что первое и второе антитела конкурируют за связывание с антигеном, как описано выше. Таким образом, термин «связывается по сути с тем же самым эпитопом или детерминантой, что и» моноклональное антитело, означает, что антитело «конкурирует» с антителом. Фраза «связывается с тем же самым или перекрывающимся эпитопом или детерминантой, что и» антитело, представляющее интерес, означает, что антитело «конкурирует» с указанным антителом, представляющим интерес, по меньшей мере, для одного (например, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5) или всех остатков на MCT1, с которыми специфически связывается указанное антитело, представляющее интерес. Идентификация одного или нескольких антител, которые связываются по сути или практически с тем же самым эпитопом, что и моноклональные антитела, описанные в данном документе, может быть легко определена с помощью сканирования аланином. Кроме того, любом из множества иммунологических скрининговых анализов, в которых можно оценить конкуренцию антител. Ряд таких анализов обычно практикуется и хорошо известен в данной области техники (см., например, патент США № 5660827, выданный 26 августа 1997 г., который специально включен в данное описание посредством ссылки). Понятно, что фактическое определение эпитопа, с которым связывается антитело, описанное в данном документе, никоим образом не требуется для идентификации антитела, которое связывается с тем же самым или по сути тем же или перекрывающимся эпитопом, что и моноклональное антитело, описанное в данном документе.

[478] Термин «трансфицированный» или «трансформированный» или «трансдуцированный» относится к процессу, посредством которого экзогенная нуклеиновая кислота переносится или вводится в клетку-хозяина. «Трансфицированная» или «трансформированная» или «трансдуцированная» клетка представляет собой клетку, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка включает первичную клетку субъекта и ее потомство.

[479] Термин «терапия», «терапевтический», «лечить» или «лечение», используемый в данном документе, в широком смысле относится к лечению заболевания, прекращению или ослаблению развития заболевания или его клинических симптомов и/или облегчению заболевания, вызывающему регресс заболевания или его клинических симптомов. Терапия включает в себя профилактику, лечение, ослабление, уменьшение, нормализацию и/или обеспечение облегчения при заболевании, признаках и/или симптомах заболевания. Терапия включает в себя нормализацию признаков и/или симптомов у пациентов с продолжающимися признаками заболевания и/или симптомами (например, воспаление, боль). Терапия также включает в себя «профилактику». Термин «ослабленный» для целей терапии в широком смысле относится к клинически значимому ослаблению признаков и/или симптомов. Терапия включает в себя лечение рецидивов или повторяющихся признаков и/или симптомов (например, воспаление, боль). Терапия включает в себя, но не ограничиваясь ими, предупреждение появления признаков и/или симптомов в любое время, а также уменьшение существующих признаков и/или симптомов и устранение существующих признаков и/или симптомов. Терапия включает в себя лечение хронических заболеваний («поддержание») и острых заболеваний. Например, лечение включает в себя лечение или предупреждение рецидивов или повторного развития признаков и/или симптомов (например, воспаление, боль).

[480] Термин «Treg клетка» (иногда также называемая Т-супрессорными клетками или индуцибельными Treg клетками или iTreg), используемый в данном документе, относится к субпопуляции Т-клеток, которые модулируют иммунную систему и поддерживают толерантность к аутоантигенам и могут устранять аутоиммунные заболевания. $Foxp3^+$ $CD4^+$ $CD25^+$ Т-регуляторные клетки (Treg) имеют определяющее значение для поддержания периферической толерантности в нормальных условиях.

[481] Термин « клетка Tr1» в данном документе относится к специфическому типу или популяции Т-регуляторных клеток, т.е. Т-регуляторных клеток 1 типа (Tr1), которые включают $CD4^+$ $Foxp3^-$ клетки, которые экспрессируют высокие уровни ИЛ-10, которые обычно характеризуются в научной литературе на основе их экспрессии CD49b и LAG-3. Указанные клетки дополнительно характеризуются способностью секретировать ИЛ-10, TGF-β и гранзим (Gz) B в отсутствие ИЛ-4 и ИЛ-17. Основные механизмы, с помощью которых клетки Tr1, по сообщениям,

контролируют иммунные ответы, включают секрецию ИЛ-10 и TGF-β и уничтожение миелоидных клеток с помощью GzB. Сообщалось, что клетки Tr1, впервые обнаруженные в периферической крови пациентов, у которых после HLA-несоответствующей трансплантации гемопоэтических стволовых клеток печени плода развивается толерантность, модулируют воспалительные и Т-эффекторные клеточные ответы при некоторых иммуноопосредованных заболеваниях. Указанные клетки могут генерироваться и размножаться *in vitro* специфичным для Ag способом, что привело к их оценке для потенциального клинического использования в клеточной терапии при лечении пациентов с аутоиммунными патологическими состояниями, такими как сахарный диабет 1 типа и рассеянный склероз.

[482] Термин «вариабельная область» или «VR», используемый в данном документе, в широком смысле относится к доменам в каждой паре легкой и тяжелой цепей в антителе, которые непосредственно участвуют в связывании антитела с антигеном. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце вариабельный домен (V_H), за которым следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь имеет вариабельный домен (V_L) на одном конце и константный домен на другом конце; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, а вариабельный домен легкой цепи выровнен с вариабельным доменом тяжелой цепи.

[483] Термин «вектор» представляет собой репликон, такой как плазмида, фаг, космида или вирус, в который может быть функционально вставлен сегмент нуклеиновой кислоты, чтобы вызвать репликацию или экспрессию сегмента. Вектор может содержать одну или несколько дополнительных последовательностей, таких как, но не ограничиваясь ими, регуляторные последовательности (например, промотор, энхансер), селективный маркер и сигнал полиаденилирования. Векторы для трансформации широкого ряда клеток-хозяев хорошо известны специалистам в данной области техники. Они включают, но не ограничиваются ими, плазмиды, фагмиды, космиды, бакуловирусы, бакмиды, бактериальные искусственные хромосомы (BAC), дрожжевые искусственные хромосомы (YAC), а также другие бактериальные, дрожжевые и вирусные векторы. Векторы, описанные в данном документе, могут быть интегрированы в геном хозяина или поддерживаться независимо в клетке или ядре.

[484] Термин «ксеногенный» относится к трансплантату, полученному от животного другого вида.

[485] При описании изобретения представлены следующие примеры, чтобы дополнительно продемонстрировать данное изобретение и его неотъемлемые преимущества. Следующие примеры предлагаются для иллюстрации, но не для ограничения заявляемого изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Дифференциальная экспрессия MCT на Т-клетках.

[486] Материалы и способы

[487] Соединение SM AZ3965 (MedChem Express, Нью-Джерси) и связанные с ним аналоги, которые имеются в продаже, использовали для выявления уникальной биологии пути MCT1 в иммунных клетках. Для ясности мы будем ссылаться на AZ396 и его аналоги с такой же аффинностью связывания, ФК и селективностью MCT1/2, что и «AZ3965».

[488] Экспрессию MCT1, MCT2, MCT4 и BSG (CD147) измеряли в нестимулированных и стимулированных лейкоцитах от двух разных доноров. Для «стимулированного» состояния клетки активировали CD3/CD28 в течение 3 суток. Стимулированные клетки тестировали в отношении ингибирования пролиферации с помощью AZ3965.

[489] Результаты

[490] MCT1 облегчает перенос метаболитов, в том числе продуктов гликолиза, что более важно в активированных Т/В-клетках (**Фиг. 1**). Уровни экспрессии MCT1, MCT2, MCT4 и BSG (CD147) для двух доноров показаны на **Фиг. 2** , демонстрируя, что активированные Т-клетки активируют MCT1 (также **Фиг. 13B**), но не MCT2; ни покоящиеся, ни активированные Т-клетки не экспрессируют MCT2 на высоких уровнях; и что у индивидуумов экспрессия MCT4 в активированных Т-клетках является вариабельной. Анализ ингибирования AZ3965 (результаты показаны на **Фиг.2**) показывает, что значением IC_{50} для подавления пролиферации Т-клеток у индивидуумов с высокой экспрессией MCT4 (0,59 нМ) по сравнению с низкой экспрессией MCT4 (0,43 нМ) не отличается. Указанные результаты демонстрируют, что MCT4 не вносит значительного вклада в транспорт лактата в

активированных Т-клетках и что специфическое для MCT1 нацеливание будет ингибировать функции Т-клеток даже в присутствии MCT4.

[491] Дополнительные данные показывают, что Т-клетки мыши с недостаточностью MCT4 идентичны клеткам ДТ после активации CD3/CD28.

Пример 2: Жизнеспособность при нацеливании на MCT1 *in vitro* и *in vivo* для воспалительных/аутоиммунных расстройств, подтвержденных с использованием ингибитора AZ3965.

[492] *In vitro*

[493] *Влияние на транспорт лактата.* Анализ лактата FLIPR использовали, чтобы показать, что AZ3965 ингибирует транспорт лактата в Т-клетках человека (как $CD4^+$, так и $CD8^+$), В-клеточной лимфоме (Дауди) и МКПК, но не в моноцитах (Фиг. 3). AZ3965 ингибировал транспорт лактата до 80% в пораженных клетках, но не влиял на транспорт в моноцитах, что важно для защиты врожденных иммунных ответов у обработанных индивидуумов.

[494] *Пролиферация Т-клеток человека.* В анализе пролиферации Т-клеток человека введение ингибитора MCT1 уменьшало пролиферацию Т-клеток со значением IC_{50} 0,54 нМ (**Фиг. 4**).

[495] *Реакция смешанных лимфоцитов человека (MLR).* В анализе MLR человека введение ингибитора MCT1 уменьшало пролиферацию Т-клеток со значением IC_{50} 1,34 нМ (**Фиг. 5**).

[496] *Секреция Т-клеточных цитокинов.* Т-клетки активировали CD3/CD28 в течение 5 суток *in vitro*. Последующее введение AZ3965 ингибировало секрецию следующих цитокинов: ИФНγ, GM-CSF, ФНОα, ИЛ-10 и ИЛ-6 (**Фиг. 6**).

[497] *Активация маркеров.* CD3/CD28 активированные Т-клетки обрабатывали в течение 4 суток 100 нМ ингибитора MCT1 на основе малой молекулы или не обрабатывали в течение 4 суток (необработанный контроль). Эти условия сравнивали с отрицательным (не окрашивающим антителом) контролем. Более 200 CD маркеров оценивали с помощью окрашивания с использованием проточной цитометрии. Ингибирование MCT1 не предупреждает Т-клеточную экспрессию маркеров клеточной поверхности (например, CD25, CD44, CD69, CD4, CD8, LFA, класс I/II и т.д.; см. **Фиг.7A-J**), что наблюдается при окрашивании с

использованием проточной цитометрией после стимуляции TCR, за исключением незначительного увеличения экспрессии поверхностных PD1 и CTLA4. Лечение лимфоцитов AZ3965 также не влияет на жизнеспособность клеток.

In vivo

[498] *Подавление GVHD и увеличение частоты Treg.* МКПК человека переносили иммунодефицитным мышам NSG в мышиной модели GVHD. Введение AZ3965 продлевало выживание мыши во время ксено-GVHD способом, превосходящим ингибитор JAK CP-690550, и снижало заболеваемость GVHD до отмены препарата (**Фиг. 8**). На 20-е сутки этого эксперимента с ксено-GVHD, дозозависимое увеличение процента $CD4^+$ Т-клеток, которые были регуляторными Т (Treg) клетками, наблюдалось в дозе AZ3965 с 2 мг/кг (2,5% Treg) до 50 мг/кг (10%) (**Фиг. 9**). В указанной модели Treg в типичном случае не выживают долго после переноса в лимфопеническую среду, частично из-за воспалительной микросреды (**ссылка 60-62**). В другом эксперименте с GVHD AZ3965 ослаблял GVHD у мыши (BALB/c -> C57BL/6), как измеряли с помощью пролиферации меченных CFSE Т-клеток.

[499] *Отторжение трансплантата.* В анализе аллотрансплантата мыши введение соединения 25 мг/кг уменьшало отторжение трансплантата (**Фиг. 10**).

[500] *Ингибирование В-клеточных ответов IgG1* Введение AZ3965 (2,5 мг/кг/сутки) также ингибировало выработку В-клеточного иммуноглобулина, что измеряли по ответам IgG1 на эритроциты овец (**Фиг. 11А**). Это введение также уменьшало долю В-клеток зародышевого центра примерно на 30% (**Фиг. 11В**).

[501] *Увеличение кетонов мочи.* В соответствии с потерей MCT1 у людей (**ссылка 49**), мыши, которым вводили AZ3965, показали измеримое, но не являющееся неблагоприятным увеличение кетонов в моче без ассоциированного кетоацидоза.

[502] Выводы

[503] Указанные исследования иллюстрируют эффективность ингибирования MCT1 в снижении ответов как Т-, так и В-клеток, что важно для терапевтического воздействия при аутоиммунных заболеваниях, таких как волчанка. Таким образом, MCT1 является жизнеспособным лекарственным целевым средством для контроля воспаления, при этом ингибирование не оказывает влияния на

врожденный иммунитет, но оказывает значительное влияние на адаптивный/гуморальный иммунитет.

Пример 3: Характеризация разработки и связывания анти-MCT1 человека антитела.

[504] *Отбор мАт Ат1 к MCT1.* Ат1 к MCT1 представляет собой крысиное анти-MCT1 человека моноклональное антитело, которое отбирали после клеточной иммунизации грызунов и скрининга связывания с использованием экспрессирующих MCT1 и нокаутных по MCT1 (KO) клеточных линий.

[505] *Аффинность связывания и перекрестная реактивность MCT1.* Анализ кинетического исключения (KinExA) показал, что Ат1 к MCT1 связывает MCT1 человека с Kd 6,3 нМ. Ат к MCT1 также сильно перекрестно реагирует с MCT1 яванского макака (cyno) и кролика, но не с MCT1 грызунов (**Фиг. 12A-D**).

[506] *Специфичность связывания.* Клетки HEK-293 ДТ экспрессируют только MCT1/CD147 и не имеют других MCT, как измеряется с помощью ОТ-ПЦР. Для измерения специфичности связывания антитела по данному изобретению в качестве отрицательного контроля можно использовать клеточную линию двойного KO HEK-293 MCT1/CD147. Кроме того, эта клеточная линия с двойным KO была разработана для экспрессии отдельных транспортеров (MCT1, MCT2, MCT3, MCT4, CD147). Используя проточную цитометрию, эти сконструированные клеточные линии могут быть измерены для экспрессии каждого белка посредством обнаружения белков, меченных Flag, и для связывания анти-MCT1 антител посредством окрашивания поверхности.

[507] *Ат1 к MCT1 связывается с активированными Т-клетками.* Ат1 к MCT1 специфически связывалось с MCT1 и подтверждало повышенную экспрессию клеточной поверхности на Т-клетках, активированных CD3/CD28 человека, на 3-е сутки (**Фиг. 13B**), но демонстрировало низкое окрашивание или отсутствие окрашивания на покоящихся наивных Т-клетках (Фиг. 13A). Это связывание подтверждает данные экспрессии, представленные на **Фиг. 2** и подтверждает прогноз на основе анализа мРНК.

Выводы

[508] Ат1 к MCT1 представляет собой высокоспецифичное крысиное антител против MCT1 человекао.

Пример 4: Характеризация *in vitro* ингибирования анти-MCT1 антителом

[509] *Ингибирование транспорта лактата.* Анализ клеточного транспорта лактата с использованием FLIPR Tetra® и pH-чувствительного красителя BCECF (ссылки 63-65) доказал, что Ат1 к MCT1 может блокировать транспорт лактата (Kd = 7,6 нМ) дозозависимым образом в активированных Т-клетках (**Фиг. 14**).

[510] *Ингибирование бромпируватной токсичности.* Поскольку MCT1 является единственным транспортером, необходимым для эффективности *in vitro* противоракового токсина бромпирувата (ссылка 66), разрабатывали второй функциональный анализ на основе клеток для измерения гибели клеток *in vitro* с использованием указанного токсина в концентрации 150 мкМ. С помощью этого анализа наблюдалось дозозависимое ингибирование токсичности бромпирувата, измеренное по защите от гибели клеток с использованием ATPlite (Kd = 1,2 нМ) (**Фиг. 15**).

[511] *Ингибирование пролиферации Т-клеток, продуцирования воспалительных цитокинов и аллогенной активации.* Ат1 к MCT1 ингибировало пролиферацию Т-клеток в культурах, стимулированных CD3/CD28, со значением EC_{50} 1,3 нМ (**Фиг. 16**). Анти-MCT1 антитело или фрагмент антитела по данному изобретению также можно тестировать в отношении его способности ингибировать продуцирование воспалительных цитокинов по сравнению с контролем в стимулированных Т-клетках на 3-е сутки после стимуляции. Ат1 к MCT1 с активацией CD3/CD28, Ат1 к MCT1 ингибировали аллогенную активацию на 50-60% в реакции со смешанными лимфоцитами человека (*см.*, например, **Фиг**. **17**).

Пример 5: Иммунорегуляторные эффекты *in vivo* при введении анти-MCT1-антитела

[512] *Защита от летального GVHD.* 3-недельные исследования ксено-GVHD (с использованием ПКМК человека -> мышей NSG) могут проводиться один раз в неделю или при контрольном введении и n = 8 мышей на группу. Защита от летального GVHD может наблюдаться ежедневно в течение всего периода тестирования Ат1 к MCT1 для различных доз анти-MCT1 антитела. Популяции Т-клеток, обозначенные абсолютным количеством лимфоцитов (ALC) и воспалительными цитокинами, могут быть измерены на 14-е сутки после введения двух доз анти-MCT1 антитела или контрольного антитела. Наблюдается снижение

экспансии $CD4^+$ Т-клеток в крови и снижение воспалительных цитокинов. Если эти данные указывают на высокую активность при низкой дозировке, то в некоторых вариантах осуществления Ат1 к MCT1 антитело или фрагмент антитела можно вводить подкожно в качестве терапевтического средства при аутоиммунном заболевании.

[513] *Увеличение кетонов мочи.* Кетонурия может быть измерена на 4-е сутки исследований ксено-GVHD в трех экспериментах и может быть проанализирована на дозозависимость. Ат1 к MCT1. Такое вызванное лекарственным средством увеличение кетонов может обеспечить фармакодинамический (ФД) биомаркер, который проксимален к ингибированию MCT1 на мишени для использования в клинических исследованиях.

[514] Кроме того, предварительные результаты метаболомики показывают повышенную выработку АТФ и НАДН, наряду с повышенным окислительным метаболизмом и жизнеспособностью в Т-клетках человека, обработанных Ат1 к MCT1.

Пример 6: Безопасность при нацеливании на MCT1 человека специфических анти-MCT1 антител

[515] *MCT1 не экспрессируется на эритроцитах человека.* Ат1 к MCT1 использовали для окрашивания эритроцитов яванского макака и эритроцитов человека (20 доноров) при контрольном условии и только при условии вторичного антитела. Результаты отчетливо показывают, что MCT1 не экспрессируется на эритроцитах человека, что резко контрастирует с эритроцитами яванского макака, которые действительно экспрессируют MCT1 на высоких уровнях (**Фиг. 18A**). MCT1 также экспрессируется на эритроцитах кролика, но не на эритроцитах крысы или бигля (**Фиг. 18B**).

[516] *Ат1 к MCT1 и AZ3965 не влияют на транспорт лактата эритроцитов человека.* Ат1 к MCT1 и AZ3965 использовали для ингибирования транспорта лактата MCT1 в очищенных эритроцитах человека с использованием транспортных тестов на основе FLIPR (**ссылка 1, 2**) в присутствии 10 мМ лактата. Уровни транспорта лактата сравнивали с условием отсутствия лактата и условием отсутствия ингибитора в присутствии лактата. Результаты показывают, что на транспорт лактата в эритроцитах человека не влияет обработка AZ3965 или Ат1 к MCT1 (**Фиг. 19**), подтверждая, что ни MCT1, ни MCT2 не необходимы для транспорта лактата в эритроцитах.

[517] *Условный штамм мыши MCT1 KO подтверждает ограниченную токсичность ингибирования MCT1.* Для оценки токсикологических проблем был разработан условный штамм мыши MCT1 KO. У этих мышей постнатально индуцировали удаление обоих аллелей MCT1 с использованием тамоксифена во всех тканях, и через 4 месяца после делеции не было обнаружено серьезных побочных эффектов. Дегенерацию сперматид наблюдалали до образования сперматозоидов, но эта потеря считалась обратимой, поскольку эта стадия спермиогенеза является гликолитической (**ссылка 82**) и фактически является мишенью для нового класса обратимых контрацептивов (**ссылка 83, 84**). Иммунологически у мышей не наблюдали изменений в целлюлярности иммунного компартмента, поддерживающего нормальный гемопоэз. Однако в соответствии с влиянием, наблюдаемым в отношении пролиферации и активации лимфоцитов ингибиторами SM и мАт, мыши, у которых был обнаружен условно дефицитный уровень MCT1 во всех тканях, показали значительное снижение антигенспецифических иммунных ответов, что измеряли в исследованиях путем переноса Т-клеток OTII (OVA-специфический трансгенный TCR) с небольшим влиянием на Т-клетки памяти. Следовательно, проблемы с ограниченной токсичностью, поднятые в этих исследованиях и у лиц с недостаточностью MCT1 (**ссылка 49**) представляют доказательства того, что специфическое анти-MCT1 мАт будет иметь мощную иммунорегуляторную активность без токсичности или с ограниченной токсичностью.

Выводы

[518] Нацеливание на MCT1 на людей с помощью анти-MCT1 мАт является безопасным. Существующие данные убедительно указывают на высокий профиль безопасности. Взрослые люди с недостаточностью MCT1 являются здоровыми (**ссылка 49, 68**); у лиц с недостаточностью MCT1 явных иммунодефицитов не наблюдали; и взрослые люди с недостаточностью MCT1, кроме того, не имеют неврологических нарушений (**ссылка 49**), предполагая отсутствие эффектов в мозге человека после потери MCT1. Отсутствие широкой токсичности у индивидуумов с мутациями MCT1, вероятно, связано со значительной избыточностью MCT.

[519] Кроме того, наши данные подтверждают, что MCT1 не является основным переносчиком лактата в эритроцитах человека, и люди с недостаточностью MCT1 не имеют какой-либо дисфункции эритроцитов.

Пример 7: Лечение волчанки с помощью ингибирования В-клеток анти-МСТ1-антителами.

[520] *Значительно повышенная экспрессия МСТ1 на плазматических клетках у больных волчанкой.* Плазматические клетки пациентов с волчанкой и здоровых пациентов окрашивали Ат1 к МСТ1 и измеряли с помощью проточной цитометрии. На **Фиг. 20** изображены иллюстративные данные проточной цитометрии для экспрессии МСТ1 в нормальных В-клетках по сравнению с В-клетками при волчанке, демонстрирующие значительно повышенную экспрессию МСТ1 в случае патологических больных клеток.

Выводы

[521] Что касается В-клеток, ключевых адаптивных иммунных клеток, участвующих в патогенезе волчанки, результаты демонстрируют, что МСТ1 гораздо более высоко экспрессируется в плазматических клетках у пациентов с волчанкой (**Фиг. 20**). Таким образом, анти-МСТ1 антитела не только нацелены на метаболизм эффекторных клеток, но и способны осуществлять это во всех патогенных лимфоцитах пациентов с волчанкой.

Пример 8: Гуманизация и отбор анти-МСТ1 антител

Гуманизация

[522] Анти-МСТ1 антитело Ат1 к МСТ1 представляет собой химеру крыса/человек. Гуманизация Ат1 к МСТ1 проводится совместно с тестированием иммуногенности (он же «деиммунизация») (**ссылка 87**). Гуманизация и деиммунизация объединяются, тем самым сохраняя функцию, аффинность и специфичность, в то же время обеспечивая низкие профили иммуногенности. Удаление Т-клеточных эпитопов сводит к минимуму риск иммуногенности и, следовательно, позволяет пациентам пройти полный курс лечения. Подход объединяет тщательный анализ доменов связывания, отбор соответствующих сегментов человеческих последовательностей и применение инструментов in silico для генерации предложенных последовательностей гуманизированных антител с получением панели гуманизированных антител. Три антитела выбирают на основе аффинности.

[523] Оценка трех мАт включает оценку иммуногенности с использованием технологии EpiScreen™, в которой используется анализ дендритных клеток с

течением времени: анализ совместного культивирования Т-клеток с образцами крови > 20 здоровых доноров-добровольцев. Иммуногенность, выражаемая в процентах от положительных респондеров, сравнивается с базой данных для различных биологических препаратов клинического применения с известной клинической иммуногенностью. Цель является <10% положительных респондентов.

[524] Три мАт вместе с Ат1 к МСТ1 в качестве контроля преобразуют в полный формат IgG. «Сайленсинг-вариант» Fc-домена выбирают на IgG1. Добавление известных сайленсинг-мутаций, связанных с антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC), таких как ala/ala, к Fc-домену снижает потенциальную токсичность, сохраняя противовоспалительную эффективность МСТ1. Эти Мат экспрессируются и очищаются в масштабе 200 мг каждый, и этот материал используется для выбора одного ведущего кандидата.

Измерения аффинности

[525] Клеточный анализ используют с CD147-/- HEK-293 клетками, сконструированными для экспрессии МСТ1 (но без других МСТ), и аффинность измеряют с использованием иммуно-сенсорного анализа Sapidyne на основе кинетического исключения (KinExa). кДНК МСТ1 также вводится в CD147 -/-МСТ1-/- клетки с и без CD147 для оценки влияния этого белка-партнера на аффинность связывания Ат1 к МСТ1, поскольку известно, что CD147 влияет на поверхностную экспрессию МСТ1 (**ссылка 88**).

Функциональное тестирование *in vitro*

[526] мАт ранжируются с использованием канонического анализа активации Т-клеток. $CD4^+$ Т-клетки выделяют путем отрицательного отбора из ПКМК человека и затем инкубируют с каждым из трех гуманизированных мАт к МСТ1 или изотипическим контролем в течение 30 минут на льду. Т-клетки и антитела помещают в 96-луночные планшеты с плоским дном, покрытые анти-CD3/CD28, и культивируют в течение 72 часов, после чего собирают супернатант для анализа продукции цитокинов с помощью Luminex. Отдельно к культуре добавляют тритированный тимидин (3H) в течение 8 часов для измерения пролиферации путем включения 3H.

[527] мАт тестируют в трех независимых экспериментах с использованием уникальных доноров для подтверждения активности. Каждое антитело тестируют

при половинном логарифмическом разведении (0,01 → 30 мкг/мл), и рассчитывают значения IC_{50}, чтобы определить, какое из них наиболее эффективно (самая высокая эффективность при самой низкой концентрации).

Перекрестная реактивность не относящихся к человеку приматов (NHP)

[528] Идентичный анализ для анализа активации Т-клеток человека используется для скрининга сохранения функциональной активности у соответствующих видов для изучения токсичности, яванских обезьян (cyno), посредством использования анти-CD3 клона SP34, а также CD28, который управляет мощной пролиферацией Т-клеток у яванского макака. Цельную кровь от яванского макака получают от World Wide Primates (Флорида), а Т-клетки выделяют путем отрицательного отбора. Т-клетки инкубируют с антителами и культивируют на чашках с покрытием CD3 в течение 72 часов. Продуцирование цитокинов анализируют с помощью специфичного для не относящихся к человеку приматов (NHP) анализа Luminex, а пролиферацию измеряют путем включения 3H. Показатели IC_{50} сравниваются с человеческими.

Функциональное тестирование *in vivo*

[529] Ксено-GVHD представляет собой системное заболевание, опосредованное адоптивным переносом ксеногенных Т-клеток человека облученному хозяину-мыши. Ат1 к MCT1 тестируют в различных дозах для определения уменьшения экспансии Т-клеток и снижения уровней цитокинов в NSG-модели ксено-GVHD. Каждое из трех мАт дополнительно тестируется вместе с Ат1 к MCT1 и контрольным IgG1 для подтверждения функциональности *in vivo*. Восемь мышей на группу используют в двух повторных экспериментах, где 10, 3, 1 или 0,3 мг/кг каждого антитела вводят во время переноса ПКМК человека, а также на 2 и 4 сутки после переноса. На 14-е сутки у мышей отбирают кровь, и абсолютное количество лимфоцитов (ALC) и уровни цитокинов определяют с помощью проточной цитометрии и анализа Luminex соответственно. Вес тела каждой мыши отслеживается, и любая мышь, которая теряет более 20% своего первоначального веса тела, умерщвляется. Кривые Каплана-Мейера получают для каждого эксперимента с помощью статистического логарифмического критерия, сравнивающего каждое анти-MCT1 антитело с контролем.

Дополнительные модификации

[530] Описанная гуманизация часто поддерживает связывание, специфичность и эффективность без увеличения иммуногенности. Для дальнейшего улучшения этих свойств могут быть введены обратные мутации возле CDR для увеличения связывания и активности. В качестве альтернативы, антитела могут быть гуманизированы путем поддержания последовательностей вблизи CDR и удаления мутацией любых предсказанных иммуногенных эпитопов Т-клеток в вариабельных доменах. FcRn-связывающие мутации могут быть введены для улучшения периода полужизни антитела.

Характеристики гуманизированных антител

[531] Некоторые гуманизированные антитела по данному изобретению имеют:

a. MCT1-специфическое связывание, как показано связыванием с клетками HEK-293, которые экспрессируют только MCT1.

b. Перекрестную реактивность с яванским макаком при эффективности >90%, как с Т-клетками человека в анализе CD3/CD28 *in vitro*.

c. Иммуногенность <10% положительных респондеров среди >20 здоровых добровольных доноров.

d. Подтверждение эффективности *in vivo* в модели ксено-GVHD.

Выводы

[532] Гуманизированное мАт анти-MCT1 Ат4 отбирают, удовлетворяя вышеуказанным критериям, и ранжируют значения IC_{50} с использованием анализов CD3/CD28 *in vitro*, причем анти-MCT1 Ат4 имеют высокую активность и низкую вариабельность (в пределах и между экспериментами). Гуманизированные вариабельные тяжелые и вариабельные легкие последовательности гуманизированного анти-MCT1 антитела Ат4, а также Ат3 и Ат2 (все полученные из Ат1) содержатся в Перечне последовательностей, который предшествует формуле изобретения.

Пример 9: Созревание аффинности

[533] Гуманизированное антитело Ат4 к MCT1 является аффинно-зрелым с использованием технологии фагового дисплея.

[534] Антитело преобразуется в одноцепочечный формат Fv (scFv) (растворенный или связанный с фагом M13) и тестируется в отношении

связывания с MCT1$^+$ HEK-293 клеточной линией, используемой во время гуманизации, чтобы убедиться, что вариабельные домены совместимы с выбранным форматом, и установить исходный уровень. Для достижения этого формата scFv гены, кодирующие вариабельные тяжелые (V_H) и легкие (V_L) домены, связывают с помощью 15-аминокислотного линкера (**ссылка 89**). Затем специфические аминокислоты в CDR исходного антитела идентифицируют и направляют на рандомизированный мутагенез. Кроме того, определенные каркасные остатки могут быть преднамеренно или случайно мутированы. Полученные мутанты используются для создания библиотеки фагового дисплея scFv (приблизительно с 1×10^8 членами), представленной на поверхности фага M13. Три раунда селекции с использованием клеточной линии MCT1$^+$ проводят путем снижения концентрации антигена в каждом раунде для выявления аффинно-зрелых scFv.

[535] Аффинно-зрелые scFv секвенируют и отбирают <10 уникальных scFv и масштабируют для растворенной экспрессии и очистки с помощью IMAC. Три из них выбираются на основе аффинности и преобразуются в сайленсинг-формат IgG.

[536] Эти три ранжируются по (a) эффективности IC_{50} в анализе Т-клеток *in* vitro и (b) функции *in vivo* в модели ксено-GVHD. Ранжирование включает в себя как эффективность, так и вариабельность, при этом идеальный кандидат обладает высокой эффективностью и низкой вариабельностью. мАт с лучшим ранжированием обозначается Ат5.01 к MCT1, остальные как Ат5.02 к MCT1 и Ат5.03 к MCT1.

[537] Дополнительные раунды созревания аффинности могут быть выполнены. Последовательности иллюстративных гуманизированных аффинно-зрелых вариантов Ат1, т.е., Ат5-Ат60, можно найти в Перечне последовательностей, который предшествует формуле изобретения в данном документе.

Выводы

[538] Аффинно-зрелые гуманизированные антитела по данному изобретению могут иметь эффективность <2 мг/кг для оптимизированного подкожного введения. Данные по ксено-GVHD для Ат1 к MCT1 антитела, представляющего интерес, могут быть использованы для определения эффективности при низких дозах.

Пример 10: Физико-химическая оценка анти-MCT1 антител

[539] Ат5.01 к MCT1 оценивается в отношении подходящей надежности, растворимости и стабильности. Его особенно тестируют в отношении (a) физико-химической стабильности при повышенной температуре, (b) растворимости и (c) физических напряжений и напряжений с низким pH, наблюдаемых в типичных условиях производственного процесса.

[540] Оценка физико-химической стабильности проводится в четырех составах различных буферов, pH и наполнителей. Каждый из составов подвергается воздействию при повышенной температуре (40 °C) в течение до 4 недель, а затем оценивается в отношении (a) склонности к агрегации в димеры или высокомолекулярные частицы (с помощью SEC-HPLC, cGE и абсорбции) и (b) любого потенциального разложения в результате изомеризации, дезамидирования и/или окисления (как наблюдается по изменениям вариантов заряда по iCE).

[541] Для оценки пригодности в случае подкожного введения Ат5.01 к MCT1 готовят в дозе 150 мг/мл в двух отдельных составах. Эти образцы анализируют с помощью той же тестовой панели, которая использовалась для 4-недельной оценки стабильности, после чего следуют аналитические оценки, как указано выше.

[542] Исследование стресса с использованием физико-химических средств принудительного распада оценивает чувствительность Ат5.01 к MCT1 к распаду после многократного оттаивания, перемешивания и условий низкого pH. Исследование при низком pH имитирует условия, обычно используемые при производстве антител для инактивации потенциальных вирусов.

[543] Кроме того, 2,5 грамма очищенного антитела получают с использованием минипула CHO-DG44 DHFR. Материал анализируют на чистоту с помощью SDS-PAGE, SEC-HPLC, эндотоксина с помощью LAL и связывания с помощью проточной цитометрии.

[544] В некоторых вариантах осуществления антитела по данному изобретению могут иметь:

a. Минимальную (<10%) агрегацию, потерю чистоты и изменение вариантов заряда в течение 4-недельного исследования стабильности

b. Минимальное (<5%) изменение тех же самых характеристик в исследованиях стресса при вынужденном распаде

c. Растворимость >100 мг/мл

Пример 11: Разработка клеточных линий

[545] Высокоэкспрессирующая клеточная линия разработана для коммерческого производства Ат5.01 к MCT1 в соответствии с cGMP с использованием клеточных линий яичника китайского хомячка (CHO).

[546] Последовательности генерируются для оптимизации кодонов, синтеза генов и вставки в экспрессионные векторы. Всего готовят шесть различных кодон-оптимизированных вариантов и подтверждают экспериментальное продуцирование белка (<1 мг). Линия клеток-хозяев (CHO-M) трансфицируется с использованием шести вариантов последовательностей антител и генерируются стабильные пулы. Один из стабильных пулов выбирается и повторно трансфицируется для повышения продуктивности клеточных линий. После двух стадий клонирования 10-12 клонов с самым высоким титром размножают и криоконсервируют в качестве банка исследовательских клеток (RCB). Дальнейшая оценка клонов проводится в культурах с подпиткой, и лучшие три клона отбираются на основе титра и продуктивности. Чтобы подтвердить стабильность клона, исследование фенотипической стабильности проводят путем непрерывного пассирования клеточных линий в течение до 60 поколений, где контролируют продуцирование и продуктивность антител. Клон с наивысшим титром отбирают после подтверждения потенции *in vitro* и функции *in vivo,* как описано выше. Чтобы подтвердить качество продукта, очищенные антитела оценивают в отношении агрегации и фрагментации (с помощью SEC-HPLC) и неоднородности заряда (с помощью icIEF). Картирование пептидов с использованием RP-UPLC MS/MS проводят на самом высоком экспрессоре для подтверждения ожидаемой аминокислотной последовательности.

[547] В некоторых вариантах осуществления клон по данному изобретению может давать по меньшей мере 1 г/л. Верхние клоны могут быть повторно трансфицированы для увеличения числа копий гена мАт.

Пример 12: Разработка биомаркеров и ассоциация с заболеваниями

Разработка фармакодинамического (ФД) биомаркера

[548] Кетоны могут быть использованы в качестве ФД биомаркера. Эти метаболиты (a) легко измеряются в моче или крови, (b) могут быть индуцированы введением анти-MCT1 антитела и (c) играют вероятную роль в механизме действия (MOA), демонстрируя значительные функции иммуномодулятора самостоятельно (**ссылка 67**). Ат5.01 к MCT1 дополнительно используется в анализах T/B-клеток *in vitro* (оба типа клеток участвуют в волчанке) и в анализах *in vivo* для экспансии ФД биомаркеров.

[549] *Метаболиты.* Исследования по метаболомике используются для оценки профиля относительной концентрации приблизительно 12000 объектов на основе малых объектов, которые включают эндогенные соединения, ксенобиотики и их метаболиты, а также для полностью количественных измерений более 1100 видов липидов. Плазму крови и клетки человека выделяют из модели ксено-GVHD (Ат5.01 к MCT1 и обработанный контроль) вместе с клетками из анализов T- и B-клеток *in vitro*. Для ксено-GVHD проводятся эксперименты с 10 различными здоровыми донорами, 1 дозой и различными временными точками для сбора крови. Для исследований *in vitro* T- и B-клетки человека от 10 здоровых добровольцев (стимулированных анти-CD3/CD28 или CD40L/IL4 соответственно) или 10 больных волчанкой (без дополнительной стимуляции) обрабатывают Ат5.01 к MCT1 или контролем. Анализы проводятся с помощью масс-спектрометрической метаболомики с использованием глобальных метаболомных и липидомных технологий для идентификации и измерения аналитов, присутствующих в каждом образце. Анализ биохимических изменений включает анализ метаболического пути для указания дополнительного количества MOA в каждом анализе, и новые метаболиты деконволютируют с использованием последующего MS анализа.

[550] *Цитокины.* Данные исследований с помощью Luminex могут быть использованы для сравнения химерного Ат1 к MCT1 и обработанных контролем лейкоцитов для получения нескольких цитокинов в качестве предполагаемых биомаркеров, включая, например, ИФНγ и ИЛ10. Ат5.01 к MCT1 также используется для определения цитокиновых биомаркеров. Различия сравнивают между обработанными и необработанными клеточными популяциями из модели ксено-GVHD и анализа T- и B-клеток *in vitro*. Эксперименты с xeno-GVHD проводят

с 5 различными донорами, животных обрабатывают, по меньшей мере, 2 дозами Ат5.01 к МСТ1, и плазму собирают в 4 разных временных периодах. Оценивают корреляцию с клиническими конечными точками (принятие трансплантата или задержка отторжения) и определяют дополнительные цитокиновые биомаркеры.

[551] *Транскрипты* Транскриптомика с помощью РНК-секвенирования используется для идентификации дифференциально экспрессированных генов и путей, которые связаны с обработкой Ат5.01 к МСТ1 в клетках в модели xeno-GVHD (10 здоровых доноров) и в тестах Т- и В-клеток *in vitro* с использованием здоровых добровольцев (стимулированных анти-CD3/CD28 или CD40L/ИЛ-4 соответственно) или больных волчанкой (без дальнейшей стимуляции). Клеточные осадки подвергают выделению РНК, приготовлению поли(А)-обогащенной библиотеки и секвенированию спаренных концов на приборе Illumina. Необработанные данные доставляются в формате fastq, а биоинформатика выполняется с использованием общедоступных конвейеров для дифференциальной экспрессии (блок выравнивания STAR и DESeq2 от R/Bioconductor). Дифференциально экспрессируемые транскрипты проверяются в системах как *in vivo, так* и *in vitro*, как описано ниже.

[552] *Анализы Т- и В-клеток человека.* В дополнение к описанным выше анализам Т-клеток и ПКМК, эффекты на Т- и В-клетки измеряют в системе совместного культивирования. Т-клетки выделяют путем отрицательного отбора из ПКМК человека и совместно культивируют в течение 5 дней с очищенными CD19 В-клетками в 96-луночных планшетах с плоским дном, покрытых анти-CD3/CD28. Супернатанты собирают для измерения продуцирования Ig (IgM и общего IgG), а также маркеров активации В-клеток (CD80, CD83, CD86, МНС класса II и внутриклеточного Ig). мАт к МСТ1 или изотипический контроль добавляют в диапазоне концентраций (от 0,1 до 10 мкг/мл) в начале культивирования. Для измерения прямых эффектов в отношении активации В-клеток CD19-очищенные В-клетки культивируют с агонистическим CD40L (100 нг/мл megaCD40L, Enzo Life Sciences), ИЛ-2 (50 ЕД/мл) и ИЛ-4 (400 ЕД/мл). Пролиферацию, активацию В-клеток и продуцирование Ig оценивали в течение 5-дневного периода. Ат5.01 к МСТ1 или контроль добавляют в начале культивирования.

<u>Выбор и подтверждение биомаркера ФД</u>

[553] Кетоны мочи могут представлять собой выраженный кандидатный биомаркер. Другие образцы также исследуются (сыворотка крови/плазма крови/клетки) и анализируются в отношении идентификации изменения молекулярных компонентов (например, ацетона, ацетокислотной кислоты, β-гидроксимасляной кислоты и/или более широких классов, таких как циклические, насыщенные или ненасыщенные кетоны). Это достигается в разделе метаболомики с потенциально соответствующими (или новыми) изменениями гена/белка, обнаруженными с помощью РНК-секвенирования и/или проточной цитометрии PhosFlow. Биомаркеры ФД выбираются исходя из соотношения с патологическими конечными точками. Данные от ксено-GVHD также могут быть подтверждены с использованием дополнительных моделей, таких как мыши NSG-SGM3 (восстановленные стволовые клетки человека) и/или нокаут по MCT1 человека у мыши.

[554] *Мыши SGM3 (восстановленные стволовые клетки).* Мыши с гамма-нокаутом NOD/scid/ИЛ2-рецептора (NSG) являются стандартным мышиным штаммом для приживления клеток крови человека, особенно при длительном приживлении с использованием $CD34^+$ гемопоэтических стволовых клеток. Этот приживление генерирует большое количество лимфоцитов в крови с гораздо меньшим количеством миелоидных клеток. Недавно в эту модель была включена группа генов цитокинов человека (стальной фактор, GM-CSF и ИЛ-3, также известный как «SGM3»). Модель SGM3 поддерживает как высокий уровень лимфоцитов, так и высокий уровень миелоидных клеток человека, обеспечивая более полное приживление клеток крови человека.

[555] *Нокаут по MCT1 человека (KI) у мышей.* Генерируют мышиную модель KI/KO, в которой кДНК SLC16A1 человека (MCT1) встраивается в экзон 1 с точкой терминации, предотвращающей экспрессию гена мыши, таким образом, создавая KO гена мыши SLC16A1. Эта модель обеспечивает штамм грызунов, который позволяет Ат5.01 к MCT1 связывать эндогенную мишень MCT1. Указанные мышиный штамм используется для проведения дополнительных исследований, связанных с волчанкой, таких как перенос спленоцитов, истощенных по CD8, от мышей MCT1 KI мышам (B6 x DBA)F1, которые приблизительно соответствуют многим фенотипам, наблюдаемым при волчанке человека (активация В-клеток, анти-днДНК-антитела, гломерулонефрит, сигнатуры гена интерферона-α (**ссылки**

90, 91). В некоторых вариантах осуществления анти-MCT1 mAb по данному изобретению могут подавлять многие из этих волчаночноподобных фенотипов.

Ассоциация волчанки человека с образцами MCT1 здорового контроля и пациентов

[556] Данные на мышах и людях предполагают, что экспрессия MCT1 увеличивается в местах хронического воспаления. Например, экспрессия на клеточной поверхности MCT1 плазматическими клетками человека в периферической крови больных волчанкой значительно увеличивается по сравнению со здоровыми донорами (**Фиг. 20**). Экспрессия MCT1 изучается в клетках пациентов с волчанкой с использованием Ат5.01 к MCT1 и анализа диффенцировки. Исследования проводятся как минимум на 3 здоровых добровольцах и 3 пациентах с волчанкой.

[557] *Определить экспрессию MCT1 в нормальных клетках и клетках при волчанке*. Для определения конститутивной экспрессии MCT1 в лейкоцитах крови от здоровых доноров и пациентов с волчанкой, различных иммунных популяций, включая Т-клетки, В-клетки и NK-клетки, характеризуют проточное окрашивание для MCT1 (Ат5.01 к MCT1), CD45, CD16, CD56, CD14, CD138, CD8, CD19, CD4 и CD3. Анти-Ki67 и Cell Trace Violet используют в данном случае и ниже для пролиферации клеток.

[558] *Измерить ингибирование пролиферации Т/В-клеток* с помощью *Ат5.01 к MCT1*. Чтобы определить, ингибирует ли Ат5.01 к MCT1 пролиферацию Т- и В-клеток, очищенные Т- или В-клетки стимулируют анти-CD3/CD28 гранулами + ИЛ-2 или megaCD40L + ИЛ-4 + ИЛ-2 соответственно. Различные клеточные субпопуляции идентифицируются с использованием CD3, CD4, CD8, CCR7, CD45RA, CD127 и CD25 для Т-клеток и CD19, CD20, CD38, CD27, IgD и IgG для В-клеток. MCT1 обнаруживают с использованием коммерческих антител, которые связывают внутриклеточные эпитопы на MCT1 (эти антитела не конкурируют с Ат5.01 к MCT1).

[559] *Ингибирование пролиферации лимфоцитов при волчанке с помощью Ат5.01 к MCT1.* Ингибирование пролиферации лимфоцитов с помощью Ат5.01 к MCT1 выполняют с использованием ПКМК от больных волчанкой. Различные популяции Т и В-клеток идентифицируют путем окрашивания в отношении MCT1

(коммерческий), CD3, CD4, CD8, CCR7, CD45RA, CD127, CD25 и CD56 или отдельно CD19, CD20, CD38, CD27 и IgG.

[560] Учитывая данные, представленные на **Фиг. 20** , экспрессия MCT1 может коррелировать с тяжестью заболевания, типом и/или стадией прогрессирования. Оцениваются дополнительные пациенты и изучаются дополнительные типы клеток.

Пример 13: Исследования не относящихся к GLP токсичности/ФК/ФД у яванских макаков.

[561] *Подготовить тестируемый материал.* Получают 6 граммов Ат5.01 к MCT1 и анализируют материал в отношении чистоты (SDS-PAGE, SEC-HPLC) и уровней эндотоксина (LAL).

[562] *Не относящиеся к GLP исследования токсичности/ФК/ФД.* Выполняют 4-фазное исследование у яванских макаков, как показано в Табл. 1, включающее исследование распределения лекарственного препарата, обусловленного увеличением дозы (TMDD), сопровождаемым увеличением дозы, с последующим определением токсичности дозы, исследованием ФК с однократной дозой и ФД/TDAR. Может быть проведено биораспределение и анализ ткани семенников и сетчатки.

Таблица 1. Схема исследования NHP

№ исследования	Исследование	Доза (мг/кг)	К-во доз	Повторная доза	К-во животных	
					♂	♀
1	Повышение дозы (TMDD)	1, 10, 100	-	TBD	2	-
2	Повторная доза (токсичность)	1	2	ежене дельно	3	-
		20	4	ежене дельно	2	2
3	Однократная доза (ФК)	TBD	1	-	3	-
4	ФД (KLH TDAR)	TBD	1	-	6	6

[563] *Исследование 1* - Распределение целевого опосредованного лекарственного препарата при оценке возрастающей дозы (TMDD). Хотя MCT1 не присутствует в эритроцитах человека, он присутствует в эритроцитах яванского макака (**Фиг. 18A**). Таким образом, первое исследование у яванских макаков проводится на 2 животных, чтобы определить дозу, необходимую для преодоления поглощения эритроцитами, и оценки точной ФК и токсичности в отсутствие эритроцитов, основной мишени TMDD у яванских макак, но не в крови человека. В исследованиях NHP, где антитела связывают эритроциты, нередко индуцируется преходящая анемия (**ссылка 92**). Во время этого анемичного состояния животным повторно вводят дозу, и уровни Ат5.01 к MCT1 в сыворотке крови сравнивают с предсказанной ФК для типичного антитела. Яванские макаки получают возрастающие дозы Ат5.01 к MCT1, и анализ иммунофенотипирования/оккупации рецепторов предложит наилучшую дозу для удаления всех MCT1-связывающих эритроцитов в последующих исследованиях у яванских макаков. Временные точки для этого анализа выбираются на основе более ранних исследований (**ссылка 92**). Это позволяет оценить дозы, которые приблизительно соответствуют связыванию Ат5.01 к MCT1 с лейкоцитами у людей.

[564] При оценке TMDD идентифицируют дозу, которая учитывает приемлемую, достижимую дозировку у яванских макаков для дополнительных исследований. Из-за необычной экспрессии MCT1 на эритроцитах яванских макаков, но не на людях, оценку любого TMDD в компартменте эритроцитов яванских макаков сначала проводят перед проведением исследований токсичности и ФК

исследований. Это достигается путем измерения уровней Ат5.01 к МСТ1 в сыворотке крови и сравнения этих значений с предсказанным значением ФК для типичного антитела при мониторинге анемии.

[565] *Исследование 2* – Токсичность. Для тестирования токсичности, экспериментальное 2-недельное исследование проводят на 3 животных при низкой дозе, которая оценивается в 1 мг/кг, что выше минимального ожидаемого уровня биологического эффекта (MABEL) для этого препарата. После этого у 4 животных исследуется в >10 раз более высокая доза для измерения токсичности. Могут быть выбраны более высокие дозы, например, 50 мг/кг, если позволяет состав. График забора крови: 1-е сутки до введения дозы, через 10 минут, через 1 и 24 часа после введения дозы, непосредственно перед следующей дозой и при выпуске или при вскрытии. Клинические измерения и наблюдения за состоянием здоровья проводятся ежедневно и обобщаются еженедельно. Анализ крови, коагуляционный анализ, химический состав сыворотки, анализ инсулина, биомаркеров и оккупацию рецепторов оценивают в стандартные моменты времени. Животных, получавших более высокие дозы, вскрывают, а ткани анализируют с использованием гистопатологии.

[566] NOAEL (уровень, не вызывающих неблагоприятных нежелательных воздействий) определяют для Ат5.01 к МСТ1 у яванских макаков. NOAEL основывается на стандартных токсикологических критериях или, если это не наблюдается в исследовании токсичности, в качестве NOAEL используется самый высокий уровень сформулированной дозы. В некоторых вариантах осуществления анти-МСТ1 антитело по данному изобретению не создает значительной токсичности и не стимулирует значительное высвобождение воспалительных цитокинов.

[567] *Исследование 3* - ФК. Чтобы определить клиренс Ат5.01 к МСТ1, образцы крови отбирают у 3 яванских макаков после 1 дозы для анализа ФК в 1-е сутки до введения дозы, через 10 минут, 1, 24 и 168 часов и через 3 и 4 недели после введения дозы. ФК сыворотки крови определяют с помощью ИФА, и данные проверяют на линейность, Cmax, AUC, CL и Vd и определение терминального t1/2. Ответ антител к лекарственному препарату (ADA) также оценивается. Инструменты с использованием анти-МСТ1 Ат5.01 антител, необходимые для сэндвич-анализа ИФА ADA, получают после гипериммунизации яванских макаков (CRL) с использованием Ат5.01 к МСТ1, как описано (**ссылка 93**). Сыворотка

крови от предварительной дозы и 4-недельной после введения дозы сравнивается с использованием квалификационного анализа ADA.

[568] Антитело по данному изобретению может иметь нормальную ФК для IgG человека приблизительно 20 суток. Если ФК является более короткой, то известные мутации связывания с FcRn исследуются для улучшения периода полувыведения мАт.

[569] *Исследование 4* - ФД/TDAR. Чтобы оценить иммуномодулирующие эффекты Ат5.01 к MCT1, Т-клеточно-зависимый ответ антител (TDAR) проводят при двух уровнях дозы. В общей сложности 8 животных (2 самца, 2 самки при каждой дозе) получают одну дозу Ат5.01 к MCT1 внутривенно. Еще 4 животных (2 самца, 2 самки) получают отрицательный контроль. Животных иммунизируют KLH и Ат5.01 к MCT1 на 0-е сутки. Образцы крови собирают до начала исследования и в 7-е, 10-е, 14-е, 21-е и 28-е сутки анализируют на титры анти-KLH с помощью ИФА. В некоторых вариантах осуществления эти титры ингибируются между 25-90% анти-MCT1 антителом по данному изобретению.

[570] Антитело по данному изобретению может иметь активность, которая поддерживает подкожное (SC) введение. Модель NSG с лейкоцитами человека демонстрирует эффект при 1 мг/кг, а мишень для СК составляет ≤ 2 мг/кг. Ат1 к MCT1 имел MABEL ~ 1 мг/кг в ксено-GVHD. TDAR используется для обеспечения более точного MABEL для Ат5.01 к MCT1 у людей.

Пример 14: Планирование доклинических и клинических программ

[571] Описанные выше эксперименты представляют обширный набор данных по MOA, эффективности и безопасности.

[572] Разработка терапевтических средств с использованием анти-MCT1 антител, в том числе антител к волчанке, основана на собранных данных об эффектах Ат5.01 к MCT1 у не относящихся к человеку приматов, и в ткани человека. Будет проведено исследование 1-й фазы с возрастающей дозой на здоровых добровольцах и исследование с несколькими возрастающими дозами на пациентах с волчанкой. План второго исследования будет включать плацебо-контролируемый рандомизированный компонент с несколькими дозами для оценки клинической эффективности лечения больных волчанкой с активным (не почечным) системным заболеванием.

Пример 15: Анализ функции MCT1 *in vitro:* чувствительность к бромпирувату

[573] Клетки HEK293T предварительно обрабатывают анти-MCT1 антителом или ингибитором MCT1 на основе малой молекулы при 37 °C в течение 1 часа. Затем клетки инкубируют с цитотоксическим реагентом 3-бромпируватом (3-BrPy) в концентрациях от 25 до 500 мкМ в течение от 2 до 6 часов. АТФ из погибающих клеток будет определяться количественно с использованием коммерческого набора для определения жизнеспособности (ATPlite, PerkinElmer) в 96-луночном планшете, а жизнеспособность измеряется с помощью люминесценции. Снижение продуцирования АТФ указывает на функциональность антитела. Антитело позитивного контроля представляет собой мышиное или химерное антитело перед гуманизацией. Клеточная линия отрицательного контроля представляет собой клетки 293T с двойным нокаутом MCT1/CD147.

[574] С помощью этого анализа можно идентифицировать функциональные антагонистические анти-MCT1 антитела.

Пример 16: Исследования in vivo на не относящихся к человеку приматах, подтверждают терапевтическую эффективность и безопасность анти-MCT1 антител

[575] Люди, которые не экспрессируют MCT1 (нулевые мутанты), по сообщениям, не проявляют никакой значительной токсичности. Единственные известные аномалии, связанные с отсутствием экспрессии MCT1, включают индуцированный кетоацидоз, который наблюдается только у пациентов до подросткового возраста, а не у пожилых людей. О явных иммунных фенотипах не сообщалось. Кроме того, на основании воздействия MCT1 на иммунитет изобретатели предполагают, что эти субъекты могут даже иметь некоторую защиту от развития аутоиммунных заболеваний или аутоиммунитета.

[576] Чтобы дополнительно подтвердить безопасность и эффективность анти-MCT1 антител для терапии человека, вводили дозы 50 мг/кг анти-MCT1 человека антител яванским макакам. Как раскрыто в данном примере и подтверждается приведенной в данном документе фигурой, никакой токсичности не наблюдалось через 30 дней.

[577] Как изображено на **Фиг. 22,** в то время как MCT1 участвует в различных функциях, существуют избыточные пути, которые устраняют токсичность вне лимфатической системы. В отличие от этого, MCT1 имеет путь с единственным транспортером в лимфоидной системе (B, T-клетки), который обеспечивает эффективность рассматриваемых антагонистических анти-MCT1 антител для блокирования пути с этим транспортером и ассоциированных с ним активностей в лимфоидной системе.

[578] Как изображено на **Фиг. 23,** эритроциты яванского макака экспрессируют высокие уровни MCT1. Основываясь на этом, проверяли эффекты антагонистических анти-MCT1 антител у яванских макаков, и, в частности, изучили любые эффекты в отношении эритроцитов после введения анти-MCT1 антител. Кроме того, определяли, могут ли яванские макаки переносить терапевтически эффективную дозу антитела.

[579] Как свидетельствуют результаты на **Фиг. 24,** яванские макаки переносят повторное дозирование Ат1 при 50 мг/кг и при начальном снижении массы эритроцитов после дозирования это разрешается через короткое время. Эти результаты показывают, что антагонистическиеанти-MCT1 антитела должны быть безопасными и эффективными у приматов.

[580] Как дополнительно изображено на **Фиг. 25**, ФК данные, которые наблюдались у яванских макаков, хотя и предварительные, дополнительно указывают на то, что имело место достаточное воздействие анти-MCT1 антител, и результаты показывают, что при дозах Ат1 $\geq$ 5 мг/кг поглощение эритроцитами является насыщающим.

[581] Кроме того, было также отмечено, что через 30 дней после введения анти-MCT1 антител не наблюдалось значимой токсичности в течение жизни при достаточном воздействии, особенно после 4-недельных доз антагонистических анти-MCT1 антител (Ат1), вводимых при 50 мг/кг. В частности, никаких неблагоприятных гистологических результатов не было обнаружено во всех органах (сердце, мышца, семенник и глаз), которые оценивали с использованием H&E.

Пример 17: Токсикологическая оценка мышей при условии КО

[582] Чтобы дополнительно оценить потенциальную безопасность и эффективность антагонистических анти-МСТ1 антител в качестве терапевтических средств, изучили эффекты условного нокаута МСТ1 у мышей.

[583] Как изображено на **Фиг. 26,** оценили целевые ткани (мышцы, семенник и глаз) у мышей с нокаутом по МСТ1, индуцируемым тамоксифеном. Все изученные органы (кроме семенника) оказались нормальными без изменений, ассоциированных с генотипом. Как изображено на **Фиг. 27,** у мышей, нокаутированных по МСТ1, семенники имели меньшие размеры и микроскопические результаты свидетельствовали некоторой дегенерации сперматид.

[584] Как дополнительно изображено на **Фиг. 28**, фенотип МСТ1 КО обеспечивает устойчивый индуцируемый тамоксифеном нокдаун экспрессии МСТ1 в различных тканях-мишенях, которые были проанализированы, т.е., тимусе, селезенке, лимфатических узлах, семенниках и сетчатке, по отношению к экспрессии контрольного гена «домашнего хозяйства» (HPRT). На **Фиг. 29** дополнительно изображены фенотипические изменения в семеннике, наблюдаемые у нокаутированных мышей. Как продемонстрировано, дегенерация сперматид наблюдалась в семенниках всех нокаутированных по МСТ1 мышей (отсутствие сперматид и сперматоцитов на поздних стадиях, сниженная целлюлярность канальцев, вакуолизация и клеточные остатки). На **Фиг. 30** дополнительно сравнивается гистология семенников у мышей ДТ и МСТ1 КО и показана повышенная дегенерация сперматид у мышей с нокаутом по сравнению с диким типом.

Пример 18: Ранее описанные анти-МСТ1 антитела не проявляют антагонистической активности

[585] Существует ряд коммерчески доступных антител, которые предположительно связываются с МСТ1. На основании скрининга заявителя эти антитела не связываются с МСТ1, экспрессируемым на клеточной поверхности, и, кроме того, насколько известно авторам данного изобретения, ни одно из этих коммерчески доступных анти-МСТ1 антител не модулирует и не блокирует эффекты МСТ1.

[586] На **Фиг. 31** обобщены эти результаты с различными коммерчески доступными анти-MCT1 антителами. На фигуре изображена СИФ (вверху, проточная цитометрия, клеточное связывание живых клеток) и результаты функционального анализа с использованием бромпирувата (внизу, RLU) с использованием всех коммерчески доступных анти-MCT1 антител от Abcam (мАт и поликлональных Ат). (Номера по каталогу приведены на фигуре).

[587] Как видно из указанных результатов, эти коммерчески доступные анти-MCT1 антитела не связываются с клетками, экспрессирующими MCT1, и в результате не оказывают влияния на активность, связанную с MCT1. В противоположность этому, анти-MCT1 антитела в соответствии с данным изобретением в этих же анализах связываются с MCT1, экспрессируемым на поверхности клеток с MCT1 (на разных клетках), и эффективно блокируют транспортерную функцию MCT1 (т.е., его способность транспортировать бромпируват). Подобные результаты (не показаны) наблюдались для каждого второго коммерчески доступного анти-MCT1 антитела, которое было протестировано авторами на данный момент.

Пример 19: Гуманизация иллюстративного анти-MCT1 антитела (Ат1)

[588] Полипептиды вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи анти-MCT1 антитела крысы, используемые в предыдущем примере (Ат1 или INX310) гуманизировали с использованием известных способов для получения гуманизированных анти-MCT1 антител для лечения человека. Иллюстративные гуманизированные тяжелые и легкие цепи показаны ниже. В изображенных последовательностях полипептиды вариабельного домена тяжелой цепи или вариабельного домена легкой цепи подчеркнуты, а константные области, ассоциированные с ними (константные области IgG1), выделены жирным шрифтом. Иллюстративные последовательности содержат Fc-сайленсинг-вариант IgG1 человека/каппа каркас (IgG1 человека) (Uniprot P01857), модифицированный так, чтобы содержать мутации, которые устраняют связывание C1q и FcR (мутации E269R/K322A). Вариабельные области подчеркнуты, а константные области выделены жирным шрифтом. Сигнальные последовательности не показаны на изображенных иллюстративных последовательностях гуманизированных легких и тяжелых цепей.

Гуманизированные тяжелые цепи

>aMCT1_Humanized_VH1_hIgG1_INXsilent_HC
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YN
PSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDAWG
QGT
MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHRDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>aMCT1_Humanized_VH2_hIgG1_INXsilent_HC
QVQLKESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YN
PSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDAWG
QGT
MVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH*
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHRDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>aMCT1_Humanized_VH3_hIgG1_INXsilent_HC
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YN
PSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDAWG
QGT
LVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT*
FP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHRDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KP

REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>aMCT1_Humanized_VH4_hIgG1_INXsilent_HC
QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YN
PSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDAWG
QGT
LVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT*
FP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHRDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>aMCT1_Humanized_VH_AmbCons_hIgG1_INXsilent_HC
QVQLQESGPGLVQPTQTLSITCTVSGFSLTNYHLQWVRQTPGKGLEWMGFIRSSGNT
EYN
SEFKSRLSISRDTSKNQVFLKMNSLKTEDTGVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDAW
GQGT
TVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT*
FP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHRDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY

TL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>aMCT1_Humanized_VH_AmbMod_hIgG1_INXsilent_HC
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWMGFIRSSGNT
EYN
SEFKSRLSISRDTSKNQVYLQMNSLKTEDTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDAW
GQGT
TVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT*
FP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHRDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>aMCT1_Humanized_VH_AmbAgg_hIgG1_INXsilent_HC
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWMGFIRSSGNT
EYN
SEFKSRLTISKDTSKNQVYLQMNSLKTEDTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDAWG
QGT
TVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT*
FP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHRDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TL

PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Гуманизированные легкие цепи

>aMCT1_Humanized_VL1_hKappa_LC
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPKLLIYNRHNLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGQGTKLEIK*RTVAAPSVFIF*
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>aMCT1_Humanized_VL2_hKappa_LC
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPKLLIYNRHNLQSGV
PSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGQGTKLEIK*RTVAAPSVFIF*
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>aMCT1_Humanized_VL3_hKappa_LC
DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK*RTVAAPSVFIF*
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>aMCT1_Humanized_VL4_hKappa_LC
DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK*RTVAAPSVFIF*
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>aMCT1_Humanized_VL_AmbCons_hKappa_LC
NIQMTQSPSLLSASVGDRVTLSCKGSQNINNYLAWFQQKFGETPKLLIYNRHNLQTGIP
SRFSGSGSGTDYTLTINSLQPEDVATYFCYQYSDGYTFGGGTKVEIK*RTVAAPSVFIFP*
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>aMCT1_Humanized_VL_AmbMod_hKappa_LC
NIQMTQSPSLLSASVGDRVTISCKGSQNINNYLAWFQQKFGETPKLLIYNRHNLQTGIP
S
RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFCYQYSDGYTFGGGTKVEIK*RTVAAPSVFIFPP*
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>aMCT1_Humanized_VL_AmbAgg_hKappa_LC
NIQMTQSPSLLSASVGDRVTISCKGSQNINNYLAWFQQKFGQPPKLLIYNRHNLQTGIP
SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGGGTKVEIK*RTVAAPSVFIFP*
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[589] Иллюстративные гуманизированные анти-MCT1 антитела в соответствии с данным изобретением дополнительно изложены ниже. Иллюстративные гуманизированные антитела содержат общую легкую цепь. Выделенные жирным шрифтом остатки в последовательностях представляют собой прогнозируемые CDR (идентифицированные с использованием IMGT DomainGapAlign).

Анти-MCT1 антитело крысы (Ат1 или INX310)

> Rat Anti-MCT1 Ab _VH
QVQLKATGPGLVQPTQTLSITCTVS**GFSLTNYH**LQWVRQTPGKGLEWMGF**IRSSGNT**
EYN
SEFKSRLSISRDTSKNQVFLKMNSLKTDDTGVYYC**ARNSWYHGTYYSPGYYVMDAW**
GQGA
SVTVSS

> Rat Anti-MCT1 Ab _VL
NIHLTQSPSLLSASVGDRVTLSCKGS**QNINNY**LAWFQQKFGETPKLLIY**NRH**NLQTGIP
S
RFSGSGSGTDYTLTINSLQPEDVATYFC**YQYSDGYT**FGAGTKLELK

Гуманизированное анти-MCT1 антитело 1 (Ат2 или INX352)

> Humanized Anti-MCT1 antibody 1_VH

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**GFSLTNYH**LQWVRQPPGKGLEWIGF**IRSSGNT**
EYN
PSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYC**ARNSWYHGTYYSPGYYVMDAWG**
QGT
LVTVSS

> Humanized Anti-MCT1 antibody 1, 2 and 3 _VL

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGS**QNINNY**LAWFQQKPGKTPALLIY**NRH**NLQSGV
PS
RFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYC**YQYSDGYT**FGPGTKVDIK

Гуманизированное анти-MCT1 антитело 2 (Ат3 или INX356)

> Humanized Anti-MCT1 antibody 2_VH

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS**GFSLTNYH**LQWIRQPPGKGLEWIGF**IRSSGNT**E
YN
PSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYC**ARNSWYHGTYYSPGYYVMDAWG**
QGT
MVTVSS

> Humanized Anti-MCT1 antibody 1, 2 and 3 _VL

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGS**QNINNY**LAWFQQKPGKTPALLIY**NRH**NLQSGV
PS
RFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYC**YQYSDGYT**FGPGTKVDIK

Гуманизированное анти-MCT1 антитело 3 (Ат4 или INX364)

> Humanized Anti-MCT1 antibody 3 _VH

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**GFSLTNYH**LQWIRQPPGKGLEWIGF**IRSSGNT**E
YN
PSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYC**ARNSWYHGTYYSPGYYVMDAWG**
QGT
LVTVSS

> Humanized Anti-MCT1 antibody 1, 2 and 3 _VL

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGS**QNINNY**LAWFQQKPGKTPALLIY**NRH**NLQSGV

PS
RFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYC**YQYSDGYT**FGPGTKVDIK

<u>Сайленсинг-вариант IgG1 (константный)</u>

- E269R/K322A

>IgG1_INX_Silent
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHRDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Пример 20: Аффинно-зрелые гуманизированные анти-MCT1 антитела

[590] Полипептиды вариабельного домена тяжелой и легкой цепей крысиного анти-MCT1 антитела, раскрытые в предыдущих примерах (Ат1 или INX310), гуманизировали и подвергали аффинному созреванию с получением гуманизированных аффинно-зрелых анти-MCT1 антител, подходящие для терапии человека. Эти антитела связываются с MCT1 человека с высокой аффинностью и должны быть по сути неиммуногенными для людей. Последовательности V_H и V_L этих гуманизированных и аффинно-зрелых анти-MCT1 антител (Ат5-Ат60) содержатся в Перечне последовательностей, который непосредственно предшествует формуле изобретения данной заявки. Как и в случае с Ат1 (INX310), эти антитела можно использовать для антагонизации эффектов MCT1 *in vitro* или *in vivo,* и, исходя из их повышенной аффинности, они должны быть более эффективными, чем Ат1 (INX310). На **Фиг. 32** изображены результаты экспериментов, сравнивающие антагонистическую активность различных анти-MCT1 антител в соответствии с данным изобретением в

функциональных анализах с бромпируватом, т.е., INX420, INX356, INX364, INX444 и INX453.

[591] На **Фиг. 33** и **Фиг. 34** изображены выравнивания, сравнивающие последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи различных анти-MCT1 антител, раскрываемых в данном документе. В частности, на этих фигурах соответственно приведены последовательности V_H и V_L Ат1 (INX310), 3 полученных из них гуманизированных антитела, т.е., Ат2 (INX352), Ат3 (INX356) и Ат4 (INX364), с гуманизированными аффинно-зрелыми анти-MCT1 антителами, которые были получены из Ат1, т.е., Ат23 (INX420), Ат47 (INX444) и Ат56 (INX453). Области в прямоугольниках в этих выравниваниях показывают различия последовательностей в каркасных остатках. CDR выделены жирным шрифтом и демонстрируют изменения CDR в этих аффинно-зрелых антителах по сравнению с CDR исходного антитела Ат1 и его гуманизированных вариантов, т.е., Ат2 (INX352), Ат3 (INX356) и Ат4 (INX364).

Пример 21: Выделение других высокоаффинных функциональных анти-MCT1 антител

[592] Дополнительные анти-MCT1 человека антитела продуцировали у цыплят. Цыплят иммунизировали рекомбинантными клетками, которые экспрессируют белки MCT1 человека на своей поверхности, чтобы потенциально вызывать выработку функциональных анти-MCT1 человека антител. Сыворотку получали от этих животных и проводили скрининг анти-MCT1 связывающих антител. Нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные антитела, затем клонировали и экспрессировали в клетках-хозяевах. Такие способы привели к выделению более 100 предполагаемых MCT1 человека-связывающих антител, включая анти-MCT1 человека антитела Ат61-Ат95, имеющие последовательности, содержащиеся в Перечне последовательностей, который предшествует формуле изобретения.

[593] Указанные антитела дополнительно подвергали скринингу для выявления антител, которые специфически связываются с клетками 293, экспрессирующими MCT1. На **Фиг. 35А** изображено связывание анти-MCT1 антител с MCT^+ 293 клетками, некоторые из последовательностей которых содержатся в Перечне последовательностей, который предшествует формуле изобретения. Эти антитела идентифицированы как анти-MCT1 антитела Ат61-Ат95 в перечне последовательностей, а также идентифицированы по альтернативной

номенклатуре (обозначение «LM-XXX» или «MCT»), по которой некоторые из них идентифицированы на **Фиг. 35A** и **Фиг. 35B**. Из результатов связывания на **Фиг. 35A** видно, что многие из этих антител связываются с сопоставимой аффинностью с клетками 293, экспрессирующими MCT1, как Ат1 (INX310).

[594] Те же самые анти-MCT1 антитела, которые, как было продемонстрировано, специфически связываются с MCT1 человека, экспрессированным на поверхности клеток 293, дополнительно подвергали скринингу в функциональных анализах, которые подвергают скринингу антитела, связывающие MCT1, которые блокируют или антагонизируют эффекты MCT1 в анализе транспорта бромпируватного токсина, описанного раннее. Как дополнительно изображено на **Фиг. 35B,** эти функциональные методы скрининга продемонстрировали, что многие из этих анти-MCT1 человека антител были функциональными в этом анализе, т.е., они обеспечивали защиту от гибели клеток, как измерено с помощью ATP-lite. Эти дополнительные анти-MCT1 человека антитела обладают разнообразием последовательностей по сравнению с последовательностями Ат1 и гуманизированных и полученных из них аффинно-зрелых вариантов, которые идентифицированы в данном документе как Ат2-Ат60, т.е. ни одно из этих дополнительных анти-MCT1 антител не содержит те же самые CDR, что и Ат1-Ат60.

[595] Последовательности для этих 35 других анти-MCT1 человека антител, которые обозначены как Ат61-Ат95, можно найти в Перечне последовательностей, который предшествует формуле изобретения данной заявки. Перечень последовательностей содержит аминокислотные последовательности для CDR тяжелой и легкой цепей, полипептидов вариабельной области тяжелой и легкой цепей, полипептидов тяжелой и легкой цепей и, дополнительно содержит последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют каждое из этих 35 анти-MCT1 человека антител. Исходя из их сопоставимой аффинности связывания с MCT1 человека по сравнению с Ат1 и их функциональной активности в анализе на бромпируватный токсин, ожидается, что многие из этих антител могут быть использованы для разработки других терапевтических анти-MCT1 антител, например, путем гуманизации и/или созревания аффинности.

[596] Полученные антитела будут связываться с MCT1 человека с высокой аффинностью и, кроме того, должны быть по сути неиммуногенными для субъектов-людей. Как и в случае Ат1 (INX310) и гуманизированных или аффинно-

зрелых вариантов, полученных из них (Ат2-Ат60), гуманизированные и/или аффинно-зрелые анти-MCT1 антитела, полученные из Ат61-Ат95, потенциально могут быть использованы для антагонизации эффектов MCT1 *in vitro* или *in vitro,* и потенциально могут быть использованы при лечении заболеваний, таких как воспалительные, аутоиммунные и аллергические патологические состояния, рак, отторжение трансплантата и GVHD и другие патологические состояния, при которых терапевтически предпочтительны повышенное количество клеток TR1 и/или сниженное количество Т-эффекторных клеток, или сниженная активность MCT1.

[597] Кроме того, предполагается, что различные комбинации гуманизированных или гуманизированных аффинно-зрелых полипептидов тяжелых и легких цепей, раскрываемых в данном документе, могут быть объединены для получения других функциональных (антагонистических) анти-MCT1 антител. Также любой из иллюстративных гуманизированных или гуманизированных аффинно-зрелых полипептидов тяжелых и легких цепей, раскрываемых в данном документе, может быть дополнительно гуманизирован, или другие гуманизированные анти-MCT1 антитела, содержащие другие гуманизированные полипептиды вариабельных областей тяжелой и легкой цепи, могут быть получены из Ат1 (INX310) или любого из Ат2-Ат95 известными способами гуманизации для получения других гуманизированных анти-MCT1 антител, подходящих для терапии человека. Кроме того, эти гуманизированные последовательности могут также быть аффинно-зрелыми для получения анти-MCT1 антител, имеющих повышенную аффинность связывания. Кроме того, эти полипептиды гуманизированных или аффинно-зрелых антител могут быть включены в мультиспецифические связывающие полипептиды, которые могут иметь различные форматы, такие как биспецифические антитела, BsAb, антитела с двумя вариабельными доменами - IgG (DVD-Ig) среди других хорошо известных форматов мультиспецифических антител.

[598] Эти гуманизированные полипептиды тяжелых и легких цепей могут, кроме того, быть связаны с различными константными доменами IgG человека, например, с константными доменами IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека или их доменами или их фрагментами. Эти константные области при необходимости могут быть модифицированы для ослабления или усиления, по меньшей мере, одной эффекторной функции, такой как связывание FcR, например, связывание

FcγR (IgG), FcεRI (IgE), FcαRI (IgA), FcμR (IgM) и FcδR (IgD), связывание комплемента, активность ADCC, активность CDC, связывание FcRN и т.п. Типичные «эффекторные функции» включают, но не ограничиваются ими, связывание Clq; комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC); связывание с Fc-рецептором; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; подавление рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора; BCR) и т.п. Такие эффекторные функции обычно требуют, чтобы Fc-область была объединена с доменом связывания (например, вариабельным доменом антитела), и могут быть оценены с использованием различных анализов, известных в данной области техники, для оценки таких эффекторных функций антитела.

[599] Представленные в качестве примера гуманизированные и гуманизированные аффинно-зрелые последовательности предназначены для использования в качестве примера, так как другие способы гуманизации или созревания аффинности могут быть использованы для получения альтернативных гуманизированных полипептидов тяжелых и легких цепей, полученных из Ат1 или других анти-MCT1 антител, описанных в данном документе, которые могут быть использованы для получения гуманизированных анти-MCT1 антител для применения в терапии человека или животных. В частности, данное изобретение охватывает любое анти-MCT1 антитело, содержащее те же CDR, что и любое из Ат1-Ат95.

Пример 22: Эффективность различных анти-MCT1 антител в соответствии с данным изобретением

[600] Активность двух анти-MCT1 антител в соответствии с данным изобретением, т.е., INX420 и INX310, сравнивали в анализах, которые определяли влияние таких антител на пролиферацию $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток при различных концентрациях антител. Как изображено на **Фиг. 36A-D,** оба антитела ингибировали пролиферацию $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток. Из этих двух антител аффинно-зрелое антитело INX420 более эффективно ингибирует пролиферацию $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток и обладает однозначной нМ активностью в этих функциональных анализах.

[601] Указанные результаты демонстрируют, что указанное анти-MCT1 антитело, которое было получено путем созревания аффинности Ат1, подобно исходному

антителу Ат1, эффективно подавляет пролиферацию Т-клеток CD4+ и $CD8^+$ по сравнению с другим анти-МСТ1 антителом по данному изобретению (Ат1).

Пример 23: Эффекты in vitro анти-МСТ1 антител на клетки Tr1

[602] Анти-МСТ1 антитела в соответствии с данным изобретением дополнительно оценивали в анализах *in vitro* для оценки их эффектов на клетки Tr1. Способы, используемые для получения клеток Tr1, и анализы с использованием клеток Tr1 описаны ниже.

Получение in vitro клеток Tr1 и функциональные анализы с Tr1

[603] Клетки Tr1 получают *in vitro* с использованием стимуляции CD3/CD28 (+INX420) свежих суммарных чПКМК, и эти клетки тестируют *in vitro* в функциональных анализах с анти-МСТ1 антителами с использованием способов и материалов, изложенных ниже.

РЕАГЕНТЫ

1. 96-луночные планшеты с плоским дном для культуры ткани (Falcon, № по каталогу 353072)
2. Емкости с реагентом 50 мл (Costar, № по каталогу 4870)
3. PBS (Corning, № по каталогу 21-040-CV)
4. Среда - RPMI 1640 (HyClone, № по каталогу SH30096.01) 10% человеческая сыворотка, 1x пенициллин/ стрептомицин/ глютамин, 10 мМ HEPES
5. Среда для Jurkat - RPMI 1640 (HyClone, № по каталогу SH30096.01) 10% FBS, 1x пенициллин/ стрептомицин/ глютин, 10 мМ Hepes
6. Анти-CD3 - клон ОКТ3 (Bio X Cell, № по каталогу BE0001-2)
7. Анти-CD28 - клон 15E8 (Miltenyi Biotec, № по каталогу 130-093-375)
8. Кровь для конуса при афереза
9. Histopaque 1077
10. INX420 лот 17069-8129269
11. Versene 1x (Gibco, № по каталогу 15040-066)

Реагент	Концентрация рабочего раствора	Конечная концентрация (1x)
a-CD3 (OKT3)	5,46 мг/мл, лот 5480/1215	1 мкг/мл
a-CD28	6,16 мг/мл	2 мкг/мл
INX420	10,03 мг/мл	10 мкг/мл

<u>-1/0-е сутки: Покрытие планшетов анти-CD3</u>

1. Развести рабочий раствор OKT3 до 1 мкг/мл в PBS
2. Добавить 100 мкл 1 мкг/мл OKT3 в каждую лунку 96-луночного планшета с плоским дном
3. Инкубировать на ночь при 4°°C или 1 ч при 37 °C

<u>0-е сутки: стимуляция свежих ПКМК человека</u>

1. Приготовить свежие ПКМК из основной массы крови
   - В стерильных условиях переложить кровь в 50 мл пробирку фирмы Falcon и разбавить PBS до 30 мл
   - Медленно расположить послойно 13 мл Histopaque 1077 под разведенной кровью
   - Центрифугировать при 850x g в течение 20 минут при комнатной температуре с небольшим ускорением (1/5 или 3/9) и остановить
   - Собрать мононуклеарные клетки от границы раздела плазма крови/фиколл и ресуспендировать в 50 мл PBS, центрифугировать при 400x g в течение 5 минут.
   - Подсчитать клетки (разведение 1:10) и приготовьте чМКПК при 200 K/100 мкл ($2*10^6$/мл)

2. Вымыть планшеты с покрытием OKT3 2X в RPMI
   - Удалить PBS из планшетов
   - Незамедлительно добавить 200 мкл RPMI к лункам
   - Удалить носитель и добавить 200 мкл RPMI к лункам

3. Взять планшет с покрытием OKT3 и удалить оставшиеся RPMI. Убедиться, что все оставшиеся носители удалены с помощью промокательной пластины на

бумажных полотенцах, покрытых стерильной марлей

4. Подготовить все реагенты и мАт при 2х в RPMI, добавить 100 мкл на лунку

5. Добавить клетки при 200 k в 100 мкл и инкубировать при 37° °C/5% CO_2 на срок до 7 суток.

Если клетки культивируют дольше 7 дней, пополняют культуру 20 мкл среды, содержащей 10х мАт (CD28, INX420)

Фенотипирование Tr1

[604] Клетки Tr1, полученные из сывороток животных, обработанных анти-MCT1 антителами в соответствии с данным изобретением, фенотипируют следующим образом.

Материалы и способы:

- 100 мкл от общей крови было использовано для анализа

- кровь окрашивали с использованием протокола промывания красителя 1 для обеспечения абсолютного количества клеток с панелью Ат ниже, за которым следовало применение буфера для лизиса FACS 1х (BD Bioscience, № 349202); цельную кровь инкубировали с 10х антителом (показано ниже) и через 30 минут кровь лизировали в большом объеме 1х буфера для лизиса (по меньшей мере, 6 раз) в соответствии с инструкциями производителя; или кровь сначала лизировали АСК (10 минут), промывали в PBS и окрашивали смесью антител, точно так, как описано в таблице ниже.

Панель алгоритма внизу (для ALC крови)

FACS

Антитело	**Разведение**	**Продавец, № по кат.**	**Объем (мкл)**
Fc-гамма блок мышь + человек	1: 200 каждый	Miltenyi Biotec, 130-092-575; Fisher Scientific (eBioscience), 50-112-9053	5 + 5
hLAG3-BV421	1:200	Biolegend, 369314	5
hCD45-BV510	1:400	Biolegend, 304036	2,5
hCD3-FITC	1:100	Biolegend, 317306	10
CD49b-PE	1:50	Biolegend, 359308	20
mCD45-PercpCy5.5*	1:400	Biolegend, 103132	2,5
hCD45-RO-PECy7	1:200	Biolegend, 304230	5
hCD8-APC	1:100	Biolegend, 344722	10
hCD4-APCCy7	1:100	Biolegend, 300518	10
FACS	PBS/2% FBS/1 мМ ЭДТК	Н/д	1000 конечный

FACS (для фенотипирования Tr1 человека)

Антитело	**Разведение**	**Продавец, № по кат.**	**Объем (мкл)**
Fc-гамма-блок мышь + человек	1: 200 каждый	Miltenyi Biotec, 130-092-575; Fisher Scientific (eBioscience), 50-112-9053	5 + 5
hPD1-BV421	1:100	Biolegend, 329919	10
hCD45-BV510	1:400	Biolegend, 304036	2,5
hCD3-FITC	1:100	Biolegend, 317306	10
hTIGIT-PE	1:100	Biolegend, 372703	10
hCD62L-PercpCy5.5	1:200	Biolegend, 304824	5
hCD45-RO-PECy7	1:200	Biolegend, 304230	5
hCD8-APC	1:100	Biolegend, 344722	10
hCD4-APCCy7	1:100	Biolegend, 300518	10
FACS	PBS/2% FBS/1 мМ ЭДТК	Н/д	1000 конечный

[605] Указанные ниже антитела из алгоритма дополнительно использовали для характеристики маркеров, экспрессируемых на поверхности предполагаемых клеток Tr1.

Bioledend 342304	**PE анти-CD66a человека/c/e антитело**
Bioledend 339106	**PE анти-CD355 человека (CRTAM) антитело**
Bioledend 359128	**Анти-CD195 (CCR5) человека антитело Brilliant Violet 510™**
Bioledend 339938	**PE анти-CD161 человека (также известное как KLRB1) антитело**
Biolegend 313524	**Анти-CD278 человека/мыши/крысы (ICOS) антитело Brilliant Violet 421™**
Biolegend 338332	**Анти-CD226 человека (DNAM-1) антитело Brilliant Violet 421™**
Biolegend 302930	**Анти-CD28 человека антитело Brilliant Violet 421™**
Biolegend 349906	**PE анти-CD152 человека (CTLA-4) антитело**
Biolegend 328214	**Анти-CD39 человека антитело Brilliant Violet 421™**
Biolegend 345005	**PE анти-CD366 человека (Tim-3) антитело**

[606] Указанные ниже антитела из алгоритма дополнительно использовали для внутриклеточной характеристики маркеров, экспрессируемых внутриклеточно предполагаемыми клетками Tr1.

BD Biosciences 560213	**Конъюгированный с Alexa Fluor® 700 мышиное анти-гранзим B человека клон GB11 (APC)**
BD Biosciences 565002	**Конъюгированный с Alexa Fluor® 647 крысиное анти-Blimp-1 человека**
Biolegend 320124	**Анти-FOXP3 человека антитело Brilliant Violet 421™**

7-е сутки: Сбор клеток для FACS и анализа супрессии

1. Собрать клетки из 200 мкл культуральных сред (объединенные лунки)

2. Отделить оставшиеся клетки от планшетов путем добавления 150 мкл стерильного Versene на лунку, инкубировать в течение 10 мин при 37 °C, объединить с ранее собранными средами

3. Окрасить клетки в 50 мкл смеси антител (панель для проверки чистоты Tr1) в течение 30 мин при комнатной температуре при встряхивании (400 об./мин.) или перейти к анализу супрессии

Анализы in vitro с использованием образованных клеток Tr1

[607] Эффекты анти-MCT1 антител в соответствии с данным изобретением можно оценивать в анализах *in* vitro с использованием клеток T1r1, полученных как описано выше в анализах, например, анализах, изложенных ниже.

1. % жизнеспособности
2. количество и % $TIGIT^+$ $PD1^+$ клеток
3. Анализ супрессии с использованием CD3+ (или $TIGIT^+PD1^+$) клетками человека
4. 6/7-е сутки: супрессия пролиферации свежих ПКМК человека или Т-клеток (включая Jurkat)

[608] Иллюстративные реагенты и материалы, которые могут быть использованы в указанных анализах, описаны ниже.

Реагенты и материалы

- CD3/CD28 гранулы Dynabeads (Life Technologies, № по кат. 11131D)
- Cell Trace Violet (Invitrogen № C34557)
- Клетки-респондеры: ПКМК, Т-клетки, клетки Jurkat

Реагент	Концентрация рабочего раствора	Конечная концентрация (1x)
Cell Trace Violet	5 мМ	5 мкм
Dynabeads		2,5 мкл/лунка

РЕЗУЛЬТАТЫ

[609] Как изображено с помощью результатов на **Фиг. 37A-D** *in vitro* обработка ПКМК иллюстративным анти-MCT1 антителом, INX420, после стимуляции CD3/CD28 привела к значительному увеличению количества $PD1^+$ $TIGIT^+$ клеток. Также наблюдаемые результаты были сопоставимы с результатами, полученными с помощью ингибитора MCT1 на основе малых молекул в том же самом анализе *in vitro.*

[610] Как дополнительно показано в результатах на **Фиг. 38,** эти *in vitro* эксперименты продемонстрировали, что $PD1^+$ $TIGIIT^+$ Tr1 клетки, которые были получены в результате обработки тем же самым иллюстративным анти-MCT1 антителом, INX420, эффективно подавляют пролиферацию МКПК.

[611] Как далее изображено с помощью результатов экспериментов *in vitro* на **Фиг. 39,** в которых эксперименты оценивали пролиферацию МКПК в присутствии анти-MCT1 антитела и антагонистов ИЛ-10, было продемонстрировано, что блокирование передачи сигналов с участием ИЛ-10 антагонистом ИЛ-10 (например, анти-ИЛ10RB) не влияло на Tr1-опосредованную супрессию пролиферации МКПК, возникшей в результате обработки анти-MCT1 антителом.

[612] Вышеизложенные результаты экспериментов являются клинически значимыми, поскольку нарушения частоты/функции клеток Tr1 и их количества были продемонстрированы при ряде аутоиммунных и воспалительных заболеваний (в доклинических и клинических моделях), что указывает на то, что продуцирующие ИЛ-10 клетки Tr1 актуальны для защиты от заболеваний и то, что лекарственные средства, которые приводят к активации клеток Tr1 *in vivo,* имеют потенциальное применение для лечения/предупреждения Т-клеточно-опосредованных заболеваний, например, аутоиммунных и воспалительных патологических состояний и аллогенной трансплантации.

Пример 24: Эффект анти-MCT1 антител в анализе ксено-GvHD

[613] Иллюстративные анти-MCT1 антитела в соответствии с данным изобретением, т.е. INX420, INX413 и INX310, дополнительно оценивали в модели GVHD *in vivo* , т.е., в модели ксено-GvHD.

Модель Xeno-GvHD:

[614] В этой модели GvHD животных самцов мышей NSG обрабатывают сублетальным облучением (250 рад), и после этого эти мыши получают 2,5 × 10^6 свежих МКПК человека (0-е сутки). Первую дозу анти-MCT1 человека объединяют с клетками и вводят в/в. График последующего лечения является еженедельным (7-, 14- и 21-е сутки, IP). Как анти-MCT1 (INX420 или другой), так и контроль IgG1 человека вводят в дозе 10 мг/кг (или как указано).

[615] Для экспериментов по повторному заражению предварительно обработанные анти-MCT1 (0-е, 7-е, 14-е, 21-е сутки) мыши NSG получают вторую дозу 2,5 × 10^6 ранее замороженных МКПК человека того же самого донора (42-е сутки). Выживание и потерю веса этих мышей контролируют без дополнительной обработки антителами и сравнивают с новой когортой мышей NSG, получающих МКПК того же самого донора.

Абсолютное количество лимфоцитов (ALC).

[616] 100 мкл от общей крови использовани для анализа: кровь окрашивали с использованием протокола промывания красителя 1 для обеспечения абсолютного количества клеток с панелью Ат ниже, за которым следовало применение буфера для лизиса FACS 1x (BD Bioscience, № 349202); цельную кровь инкубировали с 10x антителом (показано ниже) и через 30 минут кровь лизировали в большом объеме 1x буфера для лизиса (по меньшей мере, 6 раз) в соответствии с инструкциями производителя; или кровь сначала лизировали АСК (10 минут), промывали в PBS и окрашивали смесью антител, точно так, как описано в таблице ниже.

Эксперименты по супрессию *ex vivo*

[617] Гуманизированных мышей NSG (обработанных анти-MCT1) умерщвляли на c67 или в другой указанный день, суспензии отдельных клеток готовили из селезенки с последующим обогащением гранулами клеток hCD3+. Выделенные клетки высевали с или без ПКМК человека от другого донора в классических условиях стимуляции анти-CD3/анти-CD28 (гранулы dynabeads, Life Technologies,

№ 11131D) в течение 72-96 часов с последующей пульсацией тритированным тимидином в течение 16 часов для оценки пролиферации.

ТАБЛИЦА: СМЕСЬ АНТИТЕЛ

BioLegend	570304	Рекомбинантный ИЛ-15 белок (без носителя)
BioLegend	581904	Рекомбинантный ИЛ-7 человека (без носителя)
BioLegend	589104	Рекомбинантный ИЛ-2 человека (без носителя)
BioLegend	372720	Очищенное анти-TIGIT человека (VSTM3) антитело Ultra-LEAF™
BioLegend	337410	PE анти-CD112 человека (нектин-2) антитело
BioLegend	337508	PE анти-CD155 человека (PVR) антитело

[618] В качестве альтернативы супрессию пролиферации свежих МКПК измеряли в качестве уменьшенного разбавления красителя Violet Cell Trace™. С этой целью маркировку клеток МКПК-респондеров проводили с помощью набора для клеточной пролиферации Cell Trace™ Violet для проточной цитометрии (C34557, Thermo Fisher). ПКПК-респондеры затем кокультивировали с различными количествами клеток Tr1 в течение 96 часов. Клетки Tr1 определяли как клетки TIGIT+PD1+, выделенные с использованием технологии магнитных гранул (Miltenyi Biotech).

Выживаемость Tr1 *ex vivo*

[619] Гуманизированных мышей NSG (обработанных анти-MCT1) умерщвляли на c32 или в другой указанный день, суспензии отдельных клеток готовили из селезенки с последующим обогащением гранулами клеток hCD3+. Выделенные клетки высевали с аналитами (см. таблицу выше) для обеспечения выживания Tr1:

РЕЗУЛЬТАТЫ

[620] Как изображено с помощью результатов на **Фиг. 40A-D** и **Фиг. 41A-C,** эти эксперименты показали, что обработка иллюстративными анти-MCT1 антителами в соответствии с данным изобретением, т.е., INX420, INX413 и INX310, в модели ксено-GvHD приводила к значительному снижению в количестве $CD3^+$, $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-эффекторных клеток по сравнению с мышами NSG, получавшими контрольное антитело. Кроме того, оба этих анти-MCT1 антитела вызывали значительное повышение количества клеток Tr1.

[621] Кроме того, как изображено с помощью результатов экспериментов на **Фиг. 42A-B,** эти же иллюстративные протестированные анти-MCT1 антитела дополнительно вызывали долговременную защиту и толерантность в модели ксено-GvHD, когда этих животных повторно заражали на 42-е сутки с помощью донорских МКПК от того же самого донора.

[622] Как дополнительно изображено с помощью результатов связывания биомаркеров, приведенных на **Фиг. 43** и **Фиг. 44,** TIGIT и PD1 являются предполагаемыми биомаркерами клеток Tr1, поскольку эти биомаркеры экспрессируются на более чем 75% Т-клеток человека в модели ксено-GvHD. Как дополнительно изображено с помощью результатов экспериментов на **Фиг. 45,** клетки Tr1 экспрессируют высокие уровни гранзима B, но не экспрессируют FOXP3 или Blimp1.

[623] Эксперименты на **Фиг. 46A-C** дополнительно продемонстрировали, что на 14-е сутки эти мыши NSG содержат много эффекторных клеток, и дополнительно показывают, что пролиферация клеток $hCD3^+$ подавляется иллюстративным анти-MCT1 антителом (INX420). Результаты экспериментов на **Фиг. 47A-B** также демонстрируют, что клетки Tr1 эффективно подавляют пролиферацию клеток $hCD3^+$ и все МКПК.

[624] На **Фиг. 48** схематически изображена кинетика образования клеток Tr1 в модели ксено-GvHD. В частности, на фигуре изображено, что анти-MCT1 антитела снижают Т-эффекторную фазу. На **Фиг. 49A-B** изображены факторы выживания Tr1 *ex vivo*. На **Фиг. 49B** также изображено, что уничтожение целевых клеток не является механизмом, посредством которого клетки Tr1 вызывают такую супрессию, и что клетки Tr1 выживают при совместном культивировании с целевыми клетками, но погибают, если культивируются индивидуально. Результаты экспериментов, изображенные на **Фиг. 49A,** демонстрируют, что анти-TIGIT и PVR лиганды не повышают выживание Tr1 *ex vivo*. В отличие от этого, как

показано далее на **Фиг. 49A,** ИЛ-2, ИЛ-7 и ИЛ-15 увеличивали выживаемость Tr1 *ex vivo* дозозависимым образом, причем выживаемость клеток Tr1 увеличивалась примерно до 75%.

Пример 25: Влияние антагониста MCT1 на основе малой молекулы на кетоз

[625] Дополнительно проводили эксперименты для оценки влияния ингибиторов MCT1 на безопасность на основе их влияния на кетоз. Как демонстрируют результаты экспериментов на **Фиг. 50A-B,** кетоз, потенцированный ингибитором MCT1 на основе малой молекулы (SMi), запускается голоданием в 8-24 часа; что SM-управляемый кетоз вызывает гипогликемию при голодании, и что обработка SMi усиливает кетоз и гипогликемию на фоне голодания.

[626] В отличие от результатов экспериментов на **Фиг. 51A-B** изображено, что голодание в течение 24 часов в присутствии и в отсутствие SMi не вызывает кетоацидоз. Скорее, авторы данного изобретения наблюдали только небольшое зависящее от голодания снижение pH (с 7,3 до 7,1) и небольшое дополнительное снижение (около 0,05) только при высоких дозах SMi.

Пример 26: Характеризация эпитопа функциональных анти-MCT1 антител с помощью экспериментов сканирования аланином

[627] Дополнительно были проведены эксперименты по сканированию аланином, чтобы идентифицировать остатки MCT1, которые составляют эпитоп или эпитопы, связанные функциональными анти-MCT1 антителами по данному изобретению. В частности, эпитоп, связанный 4 иллюстративными функциональными анти-MCT1 человека антителами (INX444, INX420, LM183 и LM186), визуализировали на модельной структуре целевого белка MCT1. Эти 4 антитела отбирали так, чтобы они были репрезентативными для антител, идентифицированных в данном документе. В частности, 2 из этих антител представляют собой варианты аффинно-зрелого мышиного анти-MCT1 человека антитела INX310 (Ab1), а другие 2 представляют собой анти-MCT1 человека антитела цыпленка. Все 4 из этих антител являются функциональными, т.е., все блокируют функцию MCT1 человека.

[628] Связывание каждого тестируемого Fab с каждым мутантным клоном в сконструированной библиотеке сканирования аланином определяли в двух повторностях с помощью высокопроизводительной проточной цитометрии. Для каждой точки фоновую флуоресценцию вычитали из необработанных данных,

которые затем нормализовали в отношении реактивности с Fab с целевым белком ДТ. Для каждого мутантного клона среднее значение связывания наносили на график как функцию экспрессии (представленной контрольной реактивностью). Для идентификации предварительных первичных критических клонов применяли порог связывания >70% ДТ с контрольным мАт или Fab и связывания <15% ДТ с тестируемыми Fab. Вторичные клоны, которые не соответствовали установленным пороговым значениям, но у которых снижена активность связывания и близость к критическим остаткам, также позволяют предположить, что мутированный остаток может быть частью антитела.

[629] Таблица ниже содержит идентифицированные критические остатки для связывания Fab, полученных из всех 4 протестированных анти-MCT1 человека антител, с мишенью (белок MCT1 человека). Критическими остатками являются остатки, у которых их мутация дала наименьшую реактивность с конкретными антителами. Подтвержденные критические остатки представляют собой аминокислоты, боковые цепи которых вносят наибольший энергетический вклад во взаимодействие антитело-эпитоп (Bogan, A.A. и Thorn, K.S.). (1998). “Anatomy of hot spots in protein interfaces”. *J. Mol. Biol.* 280, 1-9.; Lo Conte, L., Chothia, C., и Janin, J. (1999). The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J. Mol. Biol.* 285, 2177-2198, 1999); следовательно, эти остатки, вероятно, являются основными энергетическими составляющими в связывание эпитопа.

Название антитела	Остатки
INX444	T41, S285, S286, Y287, G417, D418
INX420	T41, S285, S286
INX420 350 мМ NaCl	T41, I47, S285, S286, G417, D418
LM183	E46, K289, H292
LM186	K297, Y293, H292

[630] В приведенной ниже таблице также указаны средние значения реактивности связывания (и диапазоны) для идентифицированных критических остатков, которые составляют эпитоп MCT1 для этих же 4 антител. Критическими остатками для связывания Fab (выделены красным цветом) были остатки,

мутации которых были отрицательными для связывания с тестируемыми Fab, но положительными для связывания с контрольными Fab. Были идентифицированы дополнительные вторичные остатки (выделены синим цветом), которые не соответствовали пороговым рекомендациям, но активность связывания и близость к критическим остаткам которых свидетельствовали о том, что они могут быть частью эпитопа антитела.

Реактивность связывания (% ДТ)					
Мутация	Fab INX444	Fab HS INX420	Fab HS INX420 350 нМ NaCl	мАт к LM183	мАт к LM186
T41A	4.1 (0)	40.7 (1)	4.2 (8)	135.6 (29)	138.1 (6)
I47A	101.3 (12)	85.2 (10)	14.8 (20)	107.1 (19)	104.3 (18)
S285A	4.6 (1)	33.4 (9)	7.7 (31)	104.3 (5)	93.8 (20)
S286A	0 (0)	4.0 (0)	-4.7 (5)	114.4 (4)	131.9 (11)
Y287A	22.7 (4)	77.3 (12)	35.6 (12)	96.0 (40)	86.2 (32)
G417A	18.5 (6)	51.6 (7)	18.6 (26)	96.2 (19)	112.4 (23)
D418A	15.4 (0)	74.0 (4)	13.8 (10)	85.3 (26)	95.2 (28)

[631] Критические остатки и вторичные остатки, участвующие в связывании этих 4 иллюстративных функциональных анти-MCT1 человека антител (INX444, INX420, LM183 и LM186), дополнительно визуализированы на модельной структуре целевого белка MCT1. На **Фиг. 52** показаны остатки, которые содержат предположительный эпитоп анти-MCT1 для этих 4 различных антител, идентифицированных сканированием аланином. Можно видеть, что остатки, которые составляют эпитоп для всех 4 из этих антител, содержатся в одной и той же внеклеточной области MCT1 человека, что позволяет предположить, что многие или все функциональные анти-MCT1 антитела, описанные в данном документе, вероятно, связываются с тем же самым или перекрывающимся эпитопом на MCT1 человека. На **Фиг. 53** и **Фиг. 54** дополнительно изображены специфические остатки MCT1 человека, связанные 4 тестируемыми иллюстративными анти-MCT1 антителами.

[632] На основании анализа эпитопов в данном изобретении, по меньшей мере, описано любое выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с эпитопом на MCT1 человека, выбранным из следующего:

(x) эпитопа, который содержит один или несколько остатков T41, E46, S285, S286, Y287, K289, H292, Y293, K297, G417, I47 и D418;

(xi) эпитопа, который содержит, по меньшей мере, три остатка, в котором, по меньшей мере, один, два или все три из указанных остатков содержат остаток, выбранный из T41, E46, S285, S286, Y287, K289, H292, Y293, G417, I47 и D418;

(xii) эпитопа, который содержит три остатка, в котором, по меньшей мере, один, два или все три из указанных остатков содержат T41, E46, S285, S286, Y287, K289, H292, Y293, G417, I47 и D418;

(xiii) эпитопа, который содержит от трех до шести остатков, в котором, по меньшей мере, один, два, три, четыре, пять или все шесть из указанных остатков содержат T41, E46, S285, S286, Y287, K289, H292, Y293, G417, I47 и D418;

(xiv) эпитопа, который содержит, по меньшей мере, один, два или все три остатка T41, S285 и S286;

(xv) эпитопа, который содержит T41;

(xvi) эпитопа, который содержит S286;

(xvii) эпитопа, который содержит S285;

(xviii) эпитопа, который содержит H292;

(xix) эпитопа, который содержит остатки T41, S285, S286, Y287, G417, и D418;

(xx) эпитопа, который содержит остатки T41, S285 и S286;

(xxi) эпитопа, который содержит остатки T41, I47, S285, S286, G417 и D418;

(xxii) эпитопа, который содержит остатки E46, K289 и H292;

(xxiii) эпитопа, который содержит остатки K297, Y293 и H292;

(xxiv) эпитопа, который содержит один или несколько соответствующих остатков не относящегося к человеку MCT1, выбранного из принадлежащего грызуну (например, мыши, крысе, морской свинке), кролику, цыпленку, не относящегося к человеку примату (например, яванскому макаку, шимпанзе, орангутану), корове, овце, собаке, кошке;

при этом необязательно остатки, присутствующие в указанном эпитопе, идентифицируют с использованием сканирования аланином.

[633] На основании того же самого анализа эпитопов в данном изобретении, по меньшей мере, дополнительно описано любое выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с эпитопом на человеческом MCT1, как описано выше, который может дополнительно содержать любой из следующих остатков MCT1 человека, которые содержатся в петле 1-6 MCT1 человека или соответствующих остатков, содержащихся в областях петли 1-6 MCT1 не человека, например, MCT1 грызуна или не человекообразного примата:

(i) один или несколько из остатков P37, I40, K45, E48 и T55 (петля 1);

(ii) остаток Q111 (петля 2);

(iii) остаток Q166 (петля 3);

(iv) один или несколько из остатков L284, E296, S298 (петля 4);

(v) остаток Y353 (петля 5);

(vi) один или несколько из остатков Y419, T422 (петля 6); и/или

(vii) любую комбинацию вышеизложенного.

Пример 27: Связывание анти-MCT1 человека антитела (INX444) с MCT1 мыши

[634] По меньшей мере, одно функциональное Антитело против MCT1 человека (INX444), раскрываемое в данном документе, также связывается с MCT1 мыши. Это также указывало бы на то, что область в MCT1 человека или эпитопе или остатках, с которыми Антитело против MCT1 человека взаимодействует с белком MCT1 человека, вероятно, консервативна в белках MCT1 различных видов, например человека и мышей, и, вероятно, других видов, таких как не относящиеся к человеку приматы.

[635] Более того, было продемонстрировано, что это Антитело против MCT1 человека, которое связывается с MCT1 мыши, защищает трансфектанты, экспрессирующие MCT1 мыши, от токсического действия бромпирувата. В частности, как изображено на **Фиг. 55,** это же антитело при тестировании в 2 различных концентрациях Ат (низкое 10 мкг/мл; высокое, 100 мкг/мл) защищало трансфектанты, экспрессирующие MCT1 мыши, от токсического действия

бромпирувата аналогично положительному контролю, который представляет собой AZ3965 (ингибитор MCT1 на основе малой молекулы, зеленого цвета).

[636] В отличие этого, 2 других протестированных функциональных антител против MCT1 человека, т.е., INX420 и INX438 в тех же самых экспериментах, не блокировали функцию MCT1 мыши (исходный уровень). (Обратите внимание, что контроль одних сред не достигает нулевого уровня при 150 мкМ бромпирувата, потому что клетки трансфектанта не полностью уничтожены при указанной концентрации бромпирувата).

[637] Данный результат дополнительно подтверждает, что функциональный эпитоп или остатки, с которыми указанные анти-MCT1 человека антитела взаимодействуют с белком MCT1 человека, вероятно, консервативны в белках MCT1 различных видов, что позволяет предположить, что указанные анти-MCT1 человека антитела можно использовать в анализах конкурентного связывания для скрининга других функциональных анти-MCT1 антител, т.е., антител, которые антагонизируют, ингибируют или блокируют одну или несколько активностей MCT1 человека, или антител, которые антагонизируют, ингибируют или блокируют одну или несколько активностей их ортологов, например, белков MCT1 грызунов или белков не относящихся к человеку MCT1 приматов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Литературные источники в данном списке включены посредством ссылок и цитируются посредством номера ссылки в приведенном выше описании.

1. Carpenter L, Halestrap AP. The kinetics, substrate and inhibitor specificity of the lactate transporter of Ehrlich-Lettre tumour cells studied with the intracellular pH indicator BCECF. *The Biochemical Journal*. 1994;304 (Pt 3):751-60. Epub 1994/12/15. PubMed PMID: 7818477; PMCID: PMC1137398.

2. Jackson VN, Halestrap AP. The kinetics, substrate, and inhibitor specificity of the monocarboxylate (lactate) transporter of rat liver cells determined using the fluorescent intracellular pH indicator, 2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein. *The Journal of Biological Chemistry.* 1996;271(2):861-8. Epub 1996/01/12. PubMed PMID: 8557697.

3. Araki K, Myers DK. Aerobic Glycolysis of X-Irradiated Thymocytes. *Can J Biochem* Physiol. 1963;41:2157-69. Epub 1963/10/01. PubMed PMID: 14083980.

4. Ardawi MS, Newsholme EA. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. *The Biochemical Journal*. 1983;212(3):835-42. Epub 1983/06/15. PubMed PMID: 6882397; PMCID: PMC1153161.

5. Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, Parry RV, Rathmell JC, Plas DR, Elstrom RL, June CH, Thompson CB. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity*. 2002;16(6):769-77. PubMed PMID: 12121659.

6. Pearce EJ, Everts B. Dendritic cell metabolism. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(1):18-29. doi: 10.1038/nri3771. PubMed PMID: 25534620; PMCID: PMC4495583.

7. Takeshima Y, Iwasaki Y, Okamura T, Fujio K, Yamamoto K. The metabolic regulation in immune cells and pathogenesis of systemic lupus erythematosus approximately toward new therapeutic applications approximately. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2017;40(1):12-20. Epub 2017/05/26. doi: 10.2177/jsci.40.12. PubMed PMID: 28539549.

8. Pucino V, Bombardieri M, Pitzalis C, Mauro C. Lactate at the crossroads of metabolism, inflammation, and autoimmunity. *European Journal of Immunology*. 2017;47(1):14-21. Epub 2016/11/25. doi: 10.1002/eji.201646477. PubMed PMID: 27883186.

9. Mak TW, Grusdat M, Duncan GS, Dostert C, Nonnenmacher Y, Cox M, Binsfeld C, Hao Z, Brustle A, Itsumi M, Jager C, Chen Y, Pinkenburg O, Camara B, Ollert M, Bindslev-Jensen C, Vasiliou V, Gorrini C, Lang PA, Lohoff M, Harris IS, Hiller K, Brenner D. Glutathione Primes T Cell Metabolism for Inflammation. *Immunity*. 2017;46(4):675-89. Epub 2017/04/20. doi: 10.1016/j.immuni.2017.03.019. PubMed PMID: 28423341.

10. Ma EH, Bantug G, Griss T, Condotta S, Johnson RM, Samborska B, Mainolfi N, Suri V, Guak H, Balmer ML, Verway MJ, Raissi TC, Tsui H, Boukhaled G, Henriques da Costa S, Frezza C, Krawczyk CM, Friedman A, Manfredi M, Richer MJ, Hess C, Jones RG. Serine Is an Essential Metabolite for Effector T Cell Expansion. *Cell Metab*. 2017;25(2):345-57. Epub 2017/01/24. doi: 10.1016/j.cmet.2016.12.011. PubMed PMID: 28111214.

11. Jellusova J, Cato MH, Apgar JR, Ramezani-Rad P, Leung CR, Chen C, Richardson AD, Conner EM, Benschop RJ, Woodgett JR, Rickert RC. Gsk3 is a metabolic checkpoint regulator in B cells. *Nature Immunology*. 2017;18(3):303-12. Epub 2017/01/24. doi: 10.1038/ni.3664. PubMed PMID: 28114292; PMCID: PMC5310963.

12. Gnanaprakasam JNR, Sherman JW, Wang R. MYC and HIF in shaping immune response and immune metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2017;35:63-70. Epub 2017/04/02. doi: 10.1016/j.cytogfr.2017.03.004. PubMed PMID: 28363691.

13. Mah AY, Cooper MA. Metabolic Regulation of Natural Killer Cell IFN-gamma Production. Critical reviews in immunology. 2016;36(2):131-47. Epub 2016/12/03. doi: 10.1615/*CritRevImmunol*.2016017387. PubMed PMID: 27910764; PMCID: PMC5335907.

14. Loftus RM, Finlay DK. Immunometabolism: Cellular Metabolism Turns Immune Regulator. *The Journal of Biological Chemistry*. 2016;291(1):1-10. Epub 2015/11/05. doi: 10.1074/jbc.R115.693903. PubMed PMID: 26534957; PMCID: PMC4697146.

15. Keating SE, Zaiatz-Bittencourt V, Loftus RM, Keane C, Brennan K, Finlay DK, Gardiner CM. Metabolic Reprogramming Supports IFN-gamma Production by CD56bright NK Cells. *Journal of Immunology*. 2016;196(6):2552-60. Epub 2016/02/14. doi: 10.4049/jimmunol.1501783. PubMed PMID: 26873994.

16. Cretenet G, Clerc I, Matias M, Loisel S, Craveiro M, Oburoglu L, Kinet S, Mongellaz C, Dardalhon V, Taylor N. Cell surface Glut1 levels distinguish human CD4 and CD8 T lymphocyte subsets with distinct effector functions. *Sci Rep*. 2016;6:24129.

Epub 2016/04/14. doi: 10.1038/srep24129. PubMed PMID: 27067254; PMCID: PMC4828702.

17. Adamia N, Jorjoliani L, Khachapuridze D, Katamadze N, Chkuaseli N. Allergic Diseases and Asthma in Adolescents. *Georgian Med News*. 2015(243):58-62. PubMed PMID: 26087732.

18. Yang Z, Matteson EL, Goronzy JJ, Weyand CM. T-cell metabolism in autoimmune disease. *Arthritis Research & Therapy*. 2015;17:29. Epub 2015/04/19. doi: 10.1186/s13075-015-0542-4. PubMed PMID: 25890351; PMCID: PMC4324046.

19. Pollizzi KN, Patel CH, Sun IH, Oh MH, Waickman AT, Wen J, Delgoffe GM, Powell JD. mTORC1 and mTORC2 selectively regulate CD8(+) T cell differentiation. *The Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(5):2090-108. Epub 2015/04/22. doi: 10.1172/JCI77746. PubMed PMID: 25893604; PMCID: PMC4463194.

20. Medzhitov R. Bringing Warburg to lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(10):598. Epub 2015/09/26. doi: 10.1038/nri3918. PubMed PMID: 26403193.

21. Chen H, Yang T, Zhu L, Zhao Y. Cellular metabolism on T-cell development and function. *International Reviews of Immunology*. 2015;34(1):19-33. Epub 2014/04/09. doi: 10.3109/08830185.2014.902452. PubMed PMID: 24708060.

22. Matarese G, Colamatteo A, De Rosa V. Metabolic fuelling of proper T cell functions. *Immunology Letters*. 2014;161(2):174-8. Epub 2013/12/25. doi: 10.1016/j.imlet.2013.12.012. PubMed PMID: 24365064.

23. Kugelberg E. Dendritic cells: TLR agonists trigger rapid metabolic changes. *Nature Reviews Immunology*. 2014;14(4):209. Epub 2014/03/26. doi: 10.1038/nri3652. PubMed PMID: 24662378.

24. Green DR, Rathmell J. Sweet nothings: sensing of sugar metabolites controls T cell function. *Cell Metab*. 2013;18(1):7-8. Epub 2013/07/05. doi: 10.1016/j.cmet.2013.06.009. PubMed PMID: 23823473; PMCID: PMC3749232.

25. Wang R, Green DR. Metabolic checkpoints in activated T cells. *Nature Immunology*. 2012;13(10):907-15. Epub 2012/09/20. doi: 10.1038/ni.2386. PubMed PMID: 22990888.

26. Marko AJ, Miller RA, Kelman A, Frauwirth KA. Induction of glucose metabolism in stimulated T lymphocytes is regulated by mitogen-activated protein kinase signaling.

PloS One. 2010;5(11):e15425. Epub 2010/11/19. doi: 10.1371/journal.pone.0015425. PubMed PMID: 21085672; PMCID: PMC2978105.

27. Jacobs SR, Michalek RD, Rathmell JC. IL-7 is essential for homeostatic control of T cell metabolism *in vivo*. *Journal of Immunology*. 2010;184(7):3461-9. Epub 2010/03/03. doi: 10.4049/jimmunol.0902593. PubMed PMID: 20194717; PMCID: PMC2980949.

28. Maciver NJ, Jacobs SR, Wieman HL, Wofford JA, Coloff JL, Rathmell JC. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008;84(4):949-57. Epub 2008/06/26. doi: 10.1189/jlb.0108024. PubMed PMID: 18577716; PMCID: PMC2638731.

29. Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(11):844-52. Epub 2005/10/22. doi: 10.1038/nri1710. PubMed PMID: 16239903.

30. Cham CM, Gajewski TF. Glucose availability regulates IFN-gamma production and p70S6 kinase activation in CD8+ effector T cells. *Journal of Immunology*. 2005;174(8):4670-7. Epub 2005/04/09. PubMed PMID: 15814691.

31. Rathmell JC, Elstrom RL, Cinalli RM, Thompson CB. Activated Akt promotes increased resting T cell size, CD28-independent T cell growth, and development of autoimmunity and lymphoma. *European Journal of Immunology*. 2003;33(8):2223-32. Epub 2003/07/29. doi: 10.1002/eji.200324048. PubMed PMID: 12884297.

32. Brand K, Netzker R, Aulwurm U, Hermfisse U, Fabian D, Weigert C, Schaefer D, Hamm-Kuenzelmann B. Control of thymocyte proliferation via redox-regulated expression of glycolytic genes. *Redox Rep*. 2000;5(1):52-4. Epub 2000/07/25. doi: 10.1179/rer.2000.5.1.52. PubMed PMID: 10905547.

33. Finlay DK. Regulation of glucose metabolism in T cells: new insight into the role of Phosphoinositide 3-kinases. *Frontiers in Immunology*. 2012;3:247. Epub 2012/08/15. doi: 10.3389/fimmu.2012.00247. PubMed PMID: 22891069; PMCID: PMC3413010.

34. Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch*. 2004;447(5):619-28. doi: 10.1007/s00424-003-1067-2. PubMed PMID: 12739169.

35. Halestrap AP. Monocarboxylic acid transport. *Compr Physiol*. 2013;3(4):1611-43. doi: 10.1002/cphy.c130008. PubMed PMID: 24265240.

36. Halestrap AP. The SLC16 gene family - structure, role and regulation in health and disease. *Mol Aspects Med*. 2013;34(2-3):337-49. doi: 10.1016/j.mam.2012.05.003. PubMed PMID: 23506875.

37. Halestrap AP. The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB Life*. 2012;64(1):1-9. doi: 10.1002/iub.573. PubMed PMID: 22131303.

38. Halestrap AP, Wilson MC. The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life*. 2012;64(2):109-19. doi: 10.1002/iub.572. PubMed PMID: 22162139.

39. Rusu V, Hoch E, Mercader JM, Tenen DE, Gymrek M, Hartigan CR, DeRan M, von Grotthuss M, Fontanillas P, Spooner A, Guzman G, Deik AA, Pierce KA, Dennis C, Clish CB, Carr SA, Wagner BK, Schenone M, Ng MCY, Chen BH, Consortium M, Consortium STD, Centeno-Cruz F, Zerrweck C, Orozco L, Altshuler DM, Schreiber SL, Florez JC, Jacobs SBR, Lander ES. Type 2 Diabetes Variants Disrupt Function of SLC16A11 through Two Distinct Mechanisms. *Cell*. 2017;170(1):199-212 e20. Epub 2017/07/01. doi: 10.1016/j.cell.2017.06.011. PubMed PMID: 28666119.

40. Frank H, Groger N, Diener M, Becker C, Braun T, Boettger T. Lactaturia and loss of sodium-dependent lactate uptake in the colon of SLC5A8-deficient mice. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(36):24729-37. doi: 10.1074/jbc.M802681200. PubMed PMID: 18562324; PMCID: PMC3259809.

41. Lewis IA, Campanella ME, Markley JL, Low PS. Role of band 3 in regulating metabolic flux of red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(44):18515-20. Epub 2009/10/23. doi: 10.1073/pnas.0905999106. PubMed PMID: 19846781; PMCID: PMC2773988.

42. Akashi A, Miki A, Kanamori A, Nakamura M. Aquaporin 9 expression is required for l-lactate to maintain retinal neuronal survival. *Neuroscience Letters*. 2015;589:185-90. Epub 2015/02/01. doi: 10.1016/j.neulet.2015.01.063. PubMed PMID: 25637697.

43. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, Gottfried E, Schwarz S, Rothe G, Hoves S, Renner K, Timischl B, Mackensen A, Kunz-Schughart L, Andreesen R, Krause SW, Kreutz M. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid

on human T cells. *Blood.* 2007;109(9):3812-9. Epub 2007/01/27. doi: 10.1182/blood-2006-07-035972. PubMed PMID: 17255361.

44. Michne WF, Schroeder JD, Guiles JW, Treasurywala AM, Weigelt CA, Stansberry MF, McAvoy E, Shah CR, Baine Y, Sawutz DG, et al. Novel inhibitors of the nuclear factor of activated T cells (NFAT)-mediated transcription of beta-galactosidase: potential immunosuppressive and antiinflammatory agents. *J Med Chem.* 1995;38(14):2557-69. Epub 1995/07/07. PubMed PMID: 7629796.

45. Pahlman C, Qi Z, Murray CM, Ferguson D, Bundick RV, Donald DK, Ekberg H. Immunosuppressive properties of a series of novel inhibitors of the monocarboxylate transporter MCT-1. *Transpl Int.* 2013;26(1):22-9. doi: 10.1111/j.1432-2277.2012.01579.x. PubMed PMID: 23137339.

46. Ovens MJ, Davies AJ, Wilson MC, Murray CM, Halestrap AP. AR-C155858 is a potent inhibitor of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT2 that binds to an intracellular site involving transmembrane helices 7-10. *The Biochemical Journal.* 2010;425(3):523-30. doi: 10.1042/BJ20091515. PubMed PMID: 19929853; PMCID: PMC2811425.

47. Bueno V, Binet I, Steger U, Bundick R, Ferguson D, Murray C, Donald D, Wood K. The specific monocarboxylate transporter (MCT1) inhibitor, AR-C117977, a novel immunosuppressant, prolongs allograft survival in the mouse. *Transplantation.* 2007;84(9):1204-7. doi: 10.1097/01.tp.0000287543.91765.41. PubMed PMID: 17998878.

48. Murray C. Targeting MCT1: Targeting MCT1:Role in immunosuppression. *Nat. Chem Biol.*, 1(7):371-6 2009.

49. van Hasselt PM, Ferdinandusse S, Monroe GR, Ruiter JP, Turkenburg M, Geerlings MJ, Duran K, Harakalova M, van der Zwaag B, Monavari AA, Okur I, Sharrard MJ, Cleary M, O'Connell N, Walker V, Rubio-Gozalbo ME, de Vries MC, Visser G, Houwen RH, van der Smagt JJ, Verhoeven-Duif NM, Wanders RJ, van Haaften G. Monocarboxylate transporter 1 deficiency and ketone utilization. *The New England Journal of Medicine.* 2014;371(20):1900-7. Epub 2014/11/13. doi: 10.1056/NEJMoa1407778. PubMed PMID: 25390740.

50. Guile SD, Bantick JR, Cheshire DR, Cooper ME, Davis AM, Donald DK, Evans R, Eyssade C, Ferguson DD, Hill S, Hutchinson R, Ingall AH, Kingston LP, Martin I, Martin BP, Mohammed RT, Murray C, Perry MW, Reynolds RH, Thorne PV, Wilkinson

DJ, Withnall J. Potent blockers of the monocarboxylate transporter MCT1: novel immunomodulatory compounds. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16(8):2260-5. doi: 10.1016/j.bmcl.2006.01.024. PubMed PMID: 16455256.

51. Kim Y, Choi JW, Lee JH, Kim YS. Expression of lactate/H(+) symporters MCT1 and MCT4 and their chaperone CD147 predicts tumor progression in clear cell renal cell carcinoma: immunohistochemical and The Cancer Genome Atlas data analyses. *Human Pathology*. 2015;46(1):104-12. doi: 10.1016/j.humpath.2014.09.013. PubMed PMID: 25456395.

52. Hong CS, Graham NA, Gu W, Espindola Camacho C, Mah V, Maresh EL, Alavi M, Bagryanova L, Krotee PA, Gardner BK, Behbahan IS, Horvath S, Chia D, Mellinghoff IK, Hurvitz SA, Dubinett SM, Critchlow SE, Kurdistani SK, Goodglick L, Braas D, Graeber TG, Christofk HR. MCT1 Modulates Cancer Cell Pyruvate Export and Growth of Tumors that Co-express MCT1 and MCT4. *Cell Reports*. 2016;14(7):1590-601. Epub 2016/02/16. doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.057. PubMed PMID: 26876179; PMCID: PMC4816454.

53. Yin Y, Choi SC, Xu Z, Perry DJ, Seay H, Croker BP, Sobel ES, Brusko TM, Morel L. Normalization of CD4+ T cell metabolism reverses lupus. *Sci Transl Med*. 2015;7(274):274ra18. Epub 2015/02/13. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa0835. PubMed PMID: 25673763; PMCID: PMC5292723.

54. Buck MD, O'Sullivan D, Pearce EL. T cell metabolism drives immunity. *The Journal of Experimental Medicine*. 2015;212(9):1345-60. Epub 2015/08/12. doi: 10.1084/jem.20151159. PubMed PMID: 26261266; PMCID: PMC4548052.

55. Doherty JR, Yang C, Scott KE, Cameron MD, Fallahi M, Li W, Hall MA, Amelio AL, Mishra JK, Li F, Tortosa M, Genau HM, Rounbehler RJ, Lu Y, Dang CV, Kumar KG, Butler AA, Bannister TD, Hooper AT, Unsal-Kacmaz K, Roush WR, Cleveland JL. Blocking lactate export by inhibiting the Myc target MCT1 Disables glycolysis and glutathione synthesis. *Cancer Research.* 2014;74(3):908-20. Epub 2013/11/29. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2034. PubMed PMID: 24285728; PMCID: PMC3946415.

56. Wang R, Dillon CP, Shi LZ, Milasta S, Carter R, Finkelstein D, McCormick LL, Fitzgerald P, Chi H, Munger J, Green DR. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity*. 2011;35(6):871-82. Epub 2011/12/27. doi: 10.1016/j.immuni.2011.09.021. PubMed PMID: 22195744; PMCID: PMC3248798.

57. Cho KS, Yamada T, Wynn C, Behanna HA, Hong IC, Manaves V, Nakanishi T, Hirose J, Abe Y, Jiang H, Tamura K, Saita Y. Mechanism analysis of long-term graft survival by monocarboxylate transporter-1 inhibition. *Transplantation.* 2010;90(12):1299-306. Epub 2010/11/16. doi: 10.1097/TP.0b013e3181ff8818. PubMed PMID: 21076380.

58. Ekberg H, Qi Z, Pahlman C, Veress B, Bundick RV, Craggs RI, Holness E, Edwards S, Murray CM, Ferguson D, Kerry PJ, Wilson E, Donald DK. The specific monocarboxylate transporter-1 (MCT-1) inhibitor, AR-C117977, induces donor-specific suppression, reducing acute and chronic allograft rejection in the rat. *Transplantation.* 2007;84(9):1191-9. doi: 10.1097/01.tp.0000287541.53389.be. PubMed PMID: 17998876.

59. Durrbach A, Francois H. Intracellular lactate flux: a new regulator of the allogenic immune response. *Transpl Int.* 2013;26(1):20-1. Epub 2012/12/15. doi: 10.1111/tri.12035. PubMed PMID: 23237578.

60. Rubtsov YP, Niec RE, Josefowicz S, Li L, Darce J, Mathis D, Benoist C, Rudensky AY. Stability of the regulatory T cell lineage *in vivo*. *Science.* 2010;329(5999):1667-71. Epub 2010/10/12. doi: 10.1126/science.1191996. PubMed PMID: 20929851; PMCID: PMC4262151.

61. Sakaguchi S, Vignali DA, Rudensky AY, Niec RE, Waldmann H. The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology.* 2013;13(6):461-7. Epub 2013/05/18. doi: 10.1038/nri3464. PubMed PMID: 23681097.

62. Hoeppli RE, Wu D, Cook L, Levings MK. The environment of regulatory T cell biology: cytokines, metabolites, and the microbiome. *Frontiers in Immunology.* 2015;6:61. Epub 2015/03/06. doi: 10.3389/fimmu.2015.00061. PubMed PMID: 25741338; PMCID: PMC4332351.

63. Vetter I. Development and optimization of FLIPR high throughput calcium assays for ion channels and GPCRs. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2012;740:45-82. Epub 2012/03/29. doi: 10.1007/978-94-007-2888-2_3. PubMed PMID: 22453938.

64. Manning Fox JE, Meredith D, Halestrap AP. Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *The Journal of Physiology.* 2000;529 Pt 2:285-93. Epub 2000/12/02. PubMed PMID: 11101640; PMCID: PMC2270204.

65. Murray CM, Hutchinson R, Bantick JR, Belfield GP, Benjamin AD, Brazma D, Bundick RV, Cook ID, Craggs RI, Edwards S, Evans LR, Harrison R, Holness E, Jackson AP, Jackson CG, Kingston LP, Perry MW, Ross AR, Rugman PA, Sidhu SS, Sullivan M, Taylor-Fishwick DA, Walker PC, Whitehead YM, Wilkinson DJ, Wright A, Donald DK. Monocarboxylate transporter MCT1 is a target for immunosuppression. *Nat Chem Biol*. 2005;1(7):371-6. PubMed PMID: 16370372.

66. Birsoy K, Wang T, Possemato R, Yilmaz OH, Koch CE, Chen WW, Hutchins AW, Gultekin Y, Peterson TR, Carette JE, Brummelkamp TR, Clish CB, Sabatini DM. MCT1-mediated transport of a toxic molecule is an effective strategy for targeting glycolytic tumors. *Nature Genetics*. 2013;45(1):104-8. doi: 10.1038/ng.2471. PubMed PMID: 23202129; PMCID: 3530647.

67. Youm YH, Nguyen KY, Grant RW, Goldberg EL, Bodogai M, Kim D, D'Agostino D, Planavsky N, Lupfer C, Kanneganti TD, Kang S, Horvath TL, Fahmy TM, Crawford PA, Biragyn A, Alnemri E, Dixit VD. The ketone metabolite beta-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nature Medicine*. 2015;21(3):263-9. Epub 2015/02/17. doi: 10.1038/nm.3804. PubMed PMID: 25686106; PMCID: PMC4352123.

68. Balasubramaniam S, Lewis B, Greed L, Meili D, Flier A, Yamamoto R, Bilic K, Till C, Sass JO. Heterozygous Monocarboxylate Transporter 1 (MCT1, SLC16A1) Deficiency as a Cause of Recurrent Ketoacidosis. *JIMD Rep*. 2016;29:33-8. Epub 2015/11/27. doi: 10.1007/8904_2015_519. PubMed PMID: 26608392; PMCID: PMC5059203.

69. Philp NJ, Ochrietor JD, Rudoy C, Muramatsu T, Linser PJ. Loss of MCT1, MCT3, and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5A11/basigin-null mouse. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2003;44(3):1305-11. Epub 2003/02/26. PubMed PMID: 12601063.

70. Vaihkonen LK, Poso AR. Interindividual variation in total and carrier-mediated lactate influx into red blood cells. *The American Journal of Physiology*. 1998;274(4 Pt 2):R1025-30. Epub 1998/05/12. PubMed PMID: 9575965.

71. Merezhinskaya N, Fishbein WN, Davis JI, Foellmer JW. Mutations in MCT1 cDNA in patients with symptomatic deficiency in lactate transport. *Muscle & Nerve*. 2000;23(1):90-7. Epub 1999/12/11. PubMed PMID: 10590411.

72. Koho NM, Vaihkonen LK, Poso AR. Lactate transport in red blood cells by monocarboxylate transporters. *Equine Veterinary Journal Supplement*. 2002(34):555-9. Epub 2002/10/31. doi: 10.1111/j.2042-3306.2002.tb05482.x. PubMed PMID: 12405750.

73. Koho NM, Raekallio M, Kuusela E, Vuolle J, Poso AR. Lactate transport in canine red blood cells. *Am J Vet Res*. 2008;69(8):1091-6. Epub 2008/08/05. doi: 10.2460/ajvr.69.8.1091. PubMed PMID: 18672976.

74. Koho NM, Hyyppa S, Poso AR. Monocarboxylate transporters (MCT) as lactate carriers in equine muscle and red blood cells. *Equine Veterinary Journal Supplement*. 2006(36):354-8. Epub 2007/04/04. doi: 10.1111/j.2042-3306.2006.tb05568.x. PubMed PMID: 17402447.

75. Deuticke B. Monocarboxylate transport in red blood cells: kinetics and chemical modification. *Methods Enzymol*. 1989;173:300-29. Epub 1989/01/01. PubMed PMID: 2674614.

76. Dubinsky WP, Racker E. The mechanism of lactate transport in human erythrocytes. *The Journal of Membrane Biology*. 1978;44(1):25-36. Epub 1978/12/08. PubMed PMID: 32398.

77. Pattillo RE, Gladden LB. Red blood cell lactate transport in sickle disease and sickle cell trait. *Journal of Applied Physiology*. 2005;99(3):822-7. Epub 2005/05/14. doi: 10.1152/japplphysiol.00235.2005. PubMed PMID: 15890755.

78. Poole RC, Cranmer SL, Holdup DW, Halestrap AP. Inhibition of L-lactate transport and band 3-mediated anion transport in erythrocytes by the novel stilbenedisulphonate N,N,N',N'-tetrabenzyl-4,4'-diaminostilbene-2,2'-disulpho nat e (TBenzDS). *Biochimica et Biophysica Acta*. 1991;1070(1):69-76. Epub 1991/11/18. PubMed PMID: 1751540.

79. Lengacher S, Nehiri-Sitayeb T, Steiner N, Carneiro L, Favrod C, Preitner F, Thorens B, Stehle JC, Dix L, Pralong F, Magistretti PJ, Pellerin L. Resistance to diet-induced obesity and associated metabolic perturbations in haploinsufficient monocarboxylate transporter 1 mice. *PloS One*. 2013;8(12):e82505. Epub 2013/12/25. doi: 10.1371/journal.pone.0082505. PubMed PMID: 24367518; PMCID: PMC3867350.

80. Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, Pellerin L, Magistretti PJ, Rothstein JD. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*.

2012;487(7408):443-8. Epub 2012/07/18. doi: 10.1038/nature11314. PubMed PMID: 22801498; PMCID: PMC3408792.

81. Morrison BM, Tsingalia A, Vidensky S, Lee Y, Jin L, Farah MH, Lengacher S, Magistretti PJ, Pellerin L, Rothstein JD. Deficiency in monocarboxylate transporter 1 (MCT1) in mice delays regeneration of peripheral nerves following sciatic nerve crush. *Experimental Neurology*. 2015;263:325-38. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.10.018. PubMed PMID: 25447940.

82. Yan W. Male infertility caused by spermiogenic defects: lessons from gene knockouts. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;306(1-2):24-32. Epub 2009/06/02. doi: 10.1016/j.mce.2009.03.003. PubMed PMID: 19481682; PMCID: PMC5438260.

83. Murdoch F, Goldberg E. Male contraception: another Holy Grail. *Bioorg Med Chem Lett* 2014;24(2):419-24. Epub Epub 2013 Dec 7. doi: doi: 10.1016/j.bmcl.2013.12.004.

84. Sexton JZ, Danshina PV, Lamson DR, Hughes M, House AJ, Yeh LA, O'Brien DA, Williams KP. Development and Implementation of a High Throughput Screen for the Human Sperm-Specific Isoform of Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDHS). *Curr Chem Genomics.* 2011;5:30-41. Epub 2011/07/16. doi: 10.2174/1875397301105010030. PubMed PMID: 21760877; PMCID: PMC3134944.

85. Halford SER, Jones P, Wedge S, Hirschberg S, Katugampola S, Veal G, Payne G, Bacon C, Potter S, Griffin M, Chenard-Poirier M, Petrides G, Holder G, Keun HC, Banerji U, Plummer ER. A first-in-human first-in-class (FIC) trial of the monocarboxylate transporter 1 (MCT1) inhibitor AZD3965 in patients with advanced solid tumours. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(15_suppl):2516-. doi: 10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.2516.

86. Smith AJ. New horizons in therapeutic antibody discovery: opportunities and challenges versus small-molecule therapeutics. *J Biomol Screen*. 2015;20(4):437-53. Epub 2014/12/17. doi: 10.1177/1087057114562544. PubMed PMID: 25512329.

87. Jones TD, Crompton LJ, Carr FJ, Baker MP. Deimmunization of Monoclonal Antibodies. In: Dimitrov AS, editor. *Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. p. 405-23.

88. Kirk P, Wilson MC, Heddle C, Brown MH, Barclay AN, Halestrap AP. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell

surface expression. *The EMBO Journal*. 2000;19(15):3896-904. doi: 10.1093/emboj/19.15.3896. PubMed PMID: 10921872; PMCID: 306613.

89. Toleikis L, Frenzel A. Cloning single-chain antibody fragments (ScFv) from hyrbidoma cells. *Methods in Molecular Biology*. 2012;907:59-71. Epub 2012/08/22. doi: 10.1007/978-1-61779-974-7_3. PubMed PMID: 22907345.

90. Gleichmann E, Van Elven EH, Van der Veen JP. A systemic lupus erythematosus (SLE)-like disease in mice induced by abnormal T-B cell cooperation. Preferential formation of autoantibodies characteristic of SLE. *European journal of Immunology*. 1982;12(2):152-9. Epub 1982/02/01. doi: 10.1002/eji.1830120210. PubMed PMID: 6978818.

91. Chu YW, Gress RE. Murine models of chronic graft-versus-host disease: insights and unresolved issues. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(4):365-78. Epub 2008/03/18. doi: 10.1016/j.bbmt.2007.12.002. PubMed PMID: 18342778; PMCID: PMC2376050.

92. Liu J, Wang L, Zhao F, Tseng S, Narayanan C, Shura L, Willingham S, Howard M, Prohaska S, Volkmer J, Chao M, Weissman IL, Majeti R. Pre-Clinical Development of a Humanized Anti-CD47 Antibody with Anti-Cancer Therapeutic Potential. *PloS One.* 2015;10(9):e0137345. doi: 10.1371/journal.pone.0137345. PubMed PMID: 26390038; PMCID: PMC4577081.

93. Kelley M, Ahene AB, Gorovits B, Kamerud J, King LE, McIntosh T, Yang J. Theoretical considerations and practical approaches to address the effect of anti-drug antibody (ADA) on quantification of biotherapeutics in circulation. *AAPS J.* 2013;15(3):646-58. Epub 2013/04/02. doi: 10.1208/s12248-013-9468-4. PubMed PMID: 23543601; PMCID: PMC3691419.

94. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956, 723, 309-314.

95. Koppenol, W. H.; Bounds, P. L; Dang, C. V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Rev. Cancer* 2011 , 77, 325-327.

96. Doherty, J.R.; Yang, C; Scott, K.; Cameron M.D.; Fallahi, M.; Li, W; Hall, M.A.; Amelio, A.L.; Mishra, J.K.; Li, F; Tortosa, M.; Genau, H.M.; Rounbehler, R.J.; Yungi, L.; Dang, C.V.; Kumar, K.G.; Butler, A.A.; Bannister, T.D.; Hooper, A.T.; Unsal-Kacmaz, K.; Roush, W.R.; and Cleveland, J.L. Blocking lactate export by inhibiting the myc target MCT1 disables glycolysis and glutathione synthesis. *Cancer Res.* 2014, 74, 908-920.

97. Ullah, M. S.; Davies, A. J.; Halestrap, A. P. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1 , is up-regulated by hypoxia through a HIF-1a-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 2006, 287, 9030-9037.

98. Dang, C. V. The interplay between MYC and HIF in the Warburg effect. *Ernst Schering Found Symp. Proc.* 2007, 35-53.

99. Vaupel, P.; Mayer, A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 2007, 26, 225-239.

100. Kizaka-Kondoh, S.; Inoue, M.; Harada, H.; Hiraoka, M. Tumor hypoxia: a target for selective cancer therapy. *Cancer Sci.* 2003, 94, 1021 -1028.

101. Otonkoski, T; Jiao, H; Kaminen-Ahola, N; et al. Physical exercise-induced hypoglycemia caused by failed silencing of monocarboxylate transporter 1 in pancreatic beta cells. *Am J Hum Genet* 2007; 87, 467-474.

102. Zhao, C; Wilson, M. C; Schuit, F,; Halestrap, A. P.; Rutter, G.A. Expression and distribution of lactate/monocarboxylate transporter isoforms in pancreatic islets and the exocrine pancreas. *Diabetes* 2001; 50, 361-366.

103. Otonkoski, T.; Kaminen, N,; Ustinov, J,; et al. Physical exercise-induced hyperinsulinemic hypoglycemia is an autosomal-dominant trait characterized by abnormal pyruvate-induced insulin release. *Diabetes* 2003; 52, 199-204.

104. Pullen T. J,; Sylow, L,; Sun, G.; Halestrap, A. P.; Richter, E. A.; Rutter, G. A. Overexpression of Monocarboxylate Transporter-1 (Slc16a1) in Mouse Pancreatic beta-Cells Leads to Relative Hyperinsulinism During Exercise. *Diabetes* 2012, 61, 1719-1725.

105. Roncarolo MG, Yssel H, Touraine JL, Betuel H, De Vries JE, Spits H. Autoreactive T cell clones specific for class I and class II HLA antigens isolated from a human chimera. *J Exp Med.* 1988 May 1;167(5):1523–1534

106. Bacchetta R, Bigler M, Touraine JL, Parkman R, Tovo PA, Abrams J, de Waal Malefyt R, de Vries JE, Roncarolo MG. High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 1994;179(2):493-502.

107. Winfried Barchet, Jeffrey D. Price, Marina Cella, Marco Colonna, Sandra K. MacMillan, J. Perren Cobb, Paul A. Thompson, Kenneth M. Murphy, John P. Atkinson, and Claudia Kemper. Complement-induced regulatory T cells suppress T-cell

responses but allow for dendritic-cell maturation. *Blood.* 2006 Feb 15; 107(4): 1497–1504.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ MCT1 И АНТИ-MCT1 АНТИТЕЛ

Аминокислотная последовательность MCT1 человека

SEQ ID NO:1

MPPAVGGPVGYTPPDGGWGWAVVIGAFISIGFSYAFPKSITVFFKEIEGIFHATTSEVS
WISSIMLAVMYGGGPISSILVNKYGSRIVMIVGGCLSGCGLIAASFCNTVQQLYVCIGVI
GGLGLAFNLNPALTMIGKYFYKRRPLANGLAMAGSPVFLCTLAPLNQVFFGIFGWRGS
FLILGGLLLNCCVAGALMRPIGPKPTKAGKDKSKASLEKAGKSGVKKDLHDANTDLIGR
HPKQEKRSVFQTINQFLDLTLFTHRGFLLYLSGNVIMFFGLFAPLVFLSSYGKSQHYSS
EKSAFLLSILAFVDMVARPSMGLVANTKPIRPRIQYFFAASVVANGVCHMLAPLSTTYV
GFCVYAGFFGFAFGWLSSV$_L$FETLMDLVGPQRFSSAVGLVTIVECCPV$_L$LGPPLLGRLN
DMYGDYKYTYWACGVV$_L$IISGIYLFIGMGINYRLLAKEQKANEQKKESKEEETSIDVAGK
PNEVTKAAESPDQKDTDGGPKEEESPV

VH Ат1 к MCT1 (INX310)

SEQ ID NO:2

QVQLKATGPGLVQPTQTLSITCTVS**GFSLTNYH**LQWVRQTPGKGLEWMGF**IRSSGNT**
EYNSEFKSRLSISRDTSKNQVFLKMNSLKTDDTGVYYC**ARNSWYHGTYYSPGYYVMD**
AWGQGASVTVSS

VL Ат1 к MCT1 (INX310)

SEQ ID NO:3

NIHLTQSPSLLSASVGDRVTLSCKGS**QNINNY**LAWFQQKFGETPKLLIY**NRH**NLQTGIP
SRFSGSGSGTDYTLTINSLQPEDVATYFC**YQYSDGYT**FGAGTKLELK

CDR1 VH Ат1 к MCT1 (INX310)

SEQ ID NO:4

GFSLTNYH

CDR2 VH Ат1 к MCT1 (INX310)

SEQ ID NO:5

IRSSGNT

CDR3 VH Ат1 к MCT1 (INX310)
SEQ ID NO:6
ARNSWYHGTYYSPGYYVMDAWG

CDR1 VL Ат1 к MCT1 (INX310)
SEQ ID NO:7
QNINNY

CDR2 VL Ат1 к MCT1 (INX310)
SEQ ID NO:8
NRH

CDR3 VL Ат1 к MCT1 (INX310)
SEQ ID NO:9
YQYSDGYT

Ат1 (INX310)

>INX310_VH
SEQ ID NO: 10

QVQLKATGPGLVQPTQTLSITCTVS**GFSLTNYH**LQWVRQTPGKGLEWMGF**IRSSGNT**
EYN
SEFKSRLSISRDTSKNQVFLKMNSLKTDDTGVYYC**ARNSWYHGTYYSPGYYVMDAW**
GQGA
SVTVSS

>INX310_VL
SEQ ID NO: 11

NIHLTQSPSLLSASVGDRVTLSCKGS**QNINNY**LAWFQQKFGETPKLLIY**NRH**NLQTGIP
S
RFSGSGSGTDYTLTINSLQPEDVATYFC**YQYSDGYT**FGAGTKLELK

Ат2 (INX352)

>INX352_VH

SEQ ID NO: 12

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**GFSLTNYH**LQWVRQPPGKGLEWIGF**IRSSGNT**EYN
PSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYC**ARNSWYHGTYYSPGYYVMDAWG**QGT
LVTVSS

>INX352|INX356|INX364_VL

SEQ ID NO: 13

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGS**QNINNY**LAWFQQKPGKTPALLIY**NRH**NLQSGVPS
RFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYC**YQYSDGYT**FGPGTKVDIK

Ат3 (INX356)

>INX356_VH

SEQ ID NO: 14

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS**GFSLTNYH**LQWIRQPPGKGLEWIGF**IRSSGNT**EYN
PSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYC**ARNSWYHGTYYSPGYYVMDAWG**QGT
MVTVSS

>INX352|INX356|INX364_VL

SEQ ID NO: 15

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGS**QNINNY**LAWFQQKPGKTPALLIY**NRH**NLQSGVPS
RFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYC**YQYSDGYT**FGPGTKVDIK

Ат4 (INX364)

>INX364_VH

SEQ ID NO: 16

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**GFSLTNYH**LQWIRQPPGKGLEWIGF**IRSSGNT**E
YN
PSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYC**ARNSWYHGTYYSPGYYVMDAWG**
QGT
LVTVSS

>INX352|INX356|INX364_VL

SEQ ID NO: 17

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGS**QNINNY**LAWFQQKPGKTPALLIY**NRH**NLQSGV
PS
RFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYC**YQYSDGYT**FGPGTKVDIK

сайленсинг-вариант IgG1 (константный)

E269R/K322A

>IgG1_INX_Silent

SEQ ID NO: 18

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHRDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RW

QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ПОЛИПЕПТИД ВАРИАБЕЛЬНОГО ДОМЕНА ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)

SEQ ID NO: 19

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDA
WGQGT

ПОЛИПЕПТИД ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
aMCT1_Humanized_VH1_hIgG1_INXsilent_HC

SEQ ID NO: 20

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDA
WGQGT
MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHRDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ПОЛИПЕПТИД ВАРИАБЕЛЬНОГО ДОМЕНА ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)

SEQ ID NO: 21

QVQLKESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDA
WGQGTMVTVSS

ПОЛИПЕПТИД ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
aMCT1_Humanized_VH2_hIgG1_INXsilent_HC

SEQ ID NO: 22

QVQLKESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YN
PSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDAWG
QGTMVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS*
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHRDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ПОЛИПЕПТИД ВАРИАБЕЛЬНОГО ДОМЕНА ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)

SEQ ID NO: 23

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YN
PSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDAWG
QGTLVTVSS

ПОЛИПЕПТИД ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)

aMCT1_Humanized_VH3_hIgG1_INXsilent_HC

SEQ ID NO: 24

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YN
PSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDAWG
QGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG*
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHRDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

LT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ПОЛИПЕПТИД ВАРИАБЕЛЬНОГО ДОМЕНА ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
SEQ ID NO: 25

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

ПОЛИПЕПТИД ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
aMCT1_Humanized_VH4_hIgG1_INXsilent_HC
SEQ ID NO: 26

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL*
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHRDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ПОЛИПЕПТИД ВАРИАБЕЛЬНОГО ДОМЕНА ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
SEQ ID NO: 27

QVQLQESGPGLVQPTQTLSITCTVSGFSLTNYHLQWVRQTPGKGLEWMGFIRSSGNT
EYNSEFKSRLSISRDTSKNQVFLKMNSLKTEDTGVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMD

AWGQGTTVTVSS

ПОЛИПЕПТИД ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
>aMCT1_Humanized_VH_AmbCons_hIgG1_INXsilent_HC
SEQ ID NO: 28

QVQLQESGPGLVQPTQTLSITCTVSGFSLTNYHLQWVRQTPGKGLEWMGFIRSSGNT
EYNSEFKSRLSISRDTSKNQVFLKMNSLKTEDTGVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMD
AWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA*
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHRDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ПОЛИПЕПТИД ВАРИАБЕЛЬНОГО ДОМЕНА ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
SEQ ID NO:29

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWMGFIRSSGNT
EYNSEFKSRLSISRDTSKNQVYLQMNSLKTEDTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMD
AWGQGTTVTVSS

ПОЛИПЕПТИД ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
aMCT1_Humanized_VH_AmbMod_hIgG1_INXsilent_HC
SEQ ID NO: 30

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWMGFIRSSGNT
EYNSEFKSRLSISRDTSKNQVYLQMNSLKTEDTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMD
AWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA*
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHRDPEVKFNWY

VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ПОЛИПЕПТИД ВАРИАБЕЛЬНОГО ДОМЕНА ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
SEQ ID NO: 31

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWMGFIRSSGNT
EYNSEFKSRLTISKDTSKNQVYLQMNSLKTEDTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMD
AWGQGTTVTVSS

ПОЛИПЕПТИД ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
aMCT1_Humanized_VH_AmbAgg_hIgG1_INXsilent_HC
SEQ ID NO: 32

<u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWMGFIRSSGNT
EYNSEFKSRLTISKDTSKNQVYLQMNSLKTEDTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMD
AWGQGTTVTVSS</u>*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA*
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHRDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ПОЛИПЕПТИД ВАРИАБЕЛЬНОГО ДОМЕНА ЛЕГКОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
SEQ ID NO: 33

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPKLLIYNRHNLQSGV

PS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGQGTKLEIK

ПОЛИПЕПТИД ЛЕГКОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
aMCT1_Humanized_VL1_hKappa_LC
SEQ ID NO: 34

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPKLLIYNRHNLQSGV
PS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGQGTKLEIK*RTVAAPSVFIFPP*
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ПОЛИПЕПТИД ВАРИАБЕЛЬНОГО ДОМЕНА ЛЕГКОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
SEQ ID NO: 35

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PS
RFRGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

ПОЛИПЕПТИД ЛЕГКОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
aMCT1_Humanized_VL3_hKappa_LC
SEQ ID NO: 36

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PS
RFRGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK*RTVAAPSVFIFPP*
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ПОЛИПЕПТИД ВАРИАБЕЛЬНОГО ДОМЕНА ЛЕГКОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
SEQ ID NO:37

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PS
RFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

ПОЛИПЕПТИД ЛЕГКОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
>aMCT1_Humanized_VL4_hKappa_LC
SEQ ID NO:38

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PS
RFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK*RTVAAPSVFIFPP*
S
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ПОЛИПЕПТИД ВАРИАБЕЛЬНОГО ДОМЕНА ЛЕГКОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
SEQ ID NO: 39

NIQMTQSPSLLSASVGDRVTLSCKGSQNINNYLAWFQQKFGETPKLLIYNRHNLQTGIP
S
RFSGSGSGTDYTLTINSLQPEDVATYFCYQYSDGYTFGGGTKVEIK

ПОЛИПЕПТИД ЛЕГКОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
aMCT1_Humanized_VL_AmbCons_hKappa_LC
SEQ ID NO: 40

NIQMTQSPSLLSASVGDRVTLSCKGSQNINNYLAWFQQKFGETPKLLIYNRHNLQTGIP
S
RFSGSGSGTDYTLTINSLQPEDVATYFCYQYSDGYTFGGGTKVEIK*RTVAAPSVFIFPP*
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ПОЛИПЕПТИД ВАРИАБЕЛЬНОГО ДОМЕНА ЛЕГКОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)

SEQ ID NO: 41

NIQMTQSPSLLSASVGDRVTISCKGSQNINNYLAWFQQKFGETPKLLIYNRHNLQTGIP
S
RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFCYQYSDGYTFGGGTKVEIK

ПОЛИПЕПТИД ЛЕГКОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
aMCT1_Humanized_VL_AmbMod_hKappa_LC

SEQ ID NO: 42

NIQMTQSPSLLSASVGDRVTISCKGSQNINNYLAWFQQKFGETPKLLIYNRHNLQTGIP
S
RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFCYQYSDGYTFGGGTKVEIK*RTVAAPSVFIFPP*
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ПОЛИПЕПТИД ВАРИАБЕЛЬНОГО ДОМЕНА ЛЕГКОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)

SEQ ID NO: 43

NIQMTQSPSLLSASVGDRVTISCKGSQNINNYLAWFQQKFGQPPKLLIYNRHNLQTGIP
S
RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGGGTKVEIK

ПОЛИПЕПТИД ЛЕГКОЙ ЦЕПИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Ат1 (INX310)
aMCT1_Humanized_VL_AmbAgg_hKappa_LC

SEQ ID NO: 44

NIQMTQSPSLLSASVGDRVTISCKGSQNINNYLAWFQQKFGQPPKLLIYNRHNLQTGIP
S
RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGGGTKVEIK*RTVAAPSVFIFPP*
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Ат5 (INX402)

SEQ ID NO:45

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDA
WGQGTMVTVSS

SEQ ID NO: 46

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат6 (INX403)

>VH **SEQ ID NO: 47**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 48

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат7 (INX404)

>VH **SEQ ID NO: 49**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWRHGTWYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:50**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат8 (INX405)
SEQ ID NO:51

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRFVHGTWYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:52**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат9 (INX406)

>VH **SEQ ID NO:53**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNKWIHGTWYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:54**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат10 (INX407)
> VH **SEQ ID NO: 55**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYMMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:56**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат11 (INX408)

>VH **SEQ ID NO:57**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYLMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO: 58**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат12 (INX409)

>VH **SEQ ID NO: 59**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWIHGTWYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:60**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат13 (INX410)

>VH **SEQ ID NO:61**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYWSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:62**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат14 (INX411)

>VH **SEQ ID NO:63**

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWVHGTWYSPGYYVMDA
WGQGTMVTVSS

VL **SEQ ID NO:64**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат15 (INX412)

>VH **SEQ ID NO:65**

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWVQGWWYSPGYYVMD
AWGQGTMVTVSS

>VL **SEQ ID NO:66**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат16 (INX413)

>VH **SEQ ID NO:67**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYFSPGYYLMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO: 68**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат17 (INX414)

>VH **SEQ ID NO: 69**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARKRWVHGTWYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:70**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат18 (INX415)

>VH **SEQ ID NO:71**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWMHGTWYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:72**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат19 (INX416)

>VH **SEQ ID NO:73**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARERWVHGTYYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:74**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат20 (INX417)
>VH **SEQ ID NO:75**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWVQGTYYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:76**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат21 (INX418)

>VH **SEQ ID NO:77**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWVHGTWYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:78**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат22 (INX419)

>VH **SEQ ID NO: 79**

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWVQGSYYSPGYYVMDA
WGQGTMVTVSS

>VL **SEQ ID NO:80**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат23 (NX420)

>VH **SEQ ID NO:81**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRFVHGTWYSPGYYLMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:82**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат24 (INX421)
>VH **SEQ ID NO:83**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWIHGTWYSPGYYLMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:84**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат25 (INX422)
>VH **SEQ ID NO:85**

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWVHGTWYSPGYYLMDA
WGQGTMVTVSS

>VL **SEQ ID NO:86**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат26 (INX423)
>VH **SEQ ID NO:87**

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWVQGWWYSPGYYLMD
AWGQGTMVTVSS

>VL **SEQ ID NO:88**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат27 (INX424)
>VH **SEQ ID NO: 89**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWMHGTWYSPGYYLMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:90**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат28 (INX425)
>VH **SEQ ID NO:91**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARERWVHGTYFSPGYYLMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:92**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат29 (INX426)
>VH **SEQ ID NO:93**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWVHGTWYSPGYYLMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:94**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат30 (INX427)
>VH **SEQ ID NO:95**

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWVQGSYYSPGYYLMDA
WGQGTMVTVSS

>VL **SEQ ID NO:96**

DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGV
PSRFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYSDGYTFGPGTKVDIK

Ат31 (INX428)
>VH **SEQ ID NO:97**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO: 98**

EIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYNSYNRNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPSFTFGPGTKVDIK

Ат32 (INX429)
>VH **SEQ ID NO: 99**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:100**

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDSPPYTFGLGTKLEIK

Ат33 (INX430)
>VH **SEQ ID NO:101**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:102**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат34 (INX431)
>VH **SEQ ID NO:103**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:104**

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVP
SKFSGSGSGTDFTLTINGLQPEDFATYYCQQTDSLPYTFGQGTKLEIK

Ат35 (INX432)

>VH **SEQ ID NO:105**

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDA
WGQGTMVTVSS

>VL **SEQ ID NO106**

NIHLTQSPSLLSASVGDRVTLSCKGSQNINNYLAWFQQKFGETPKLLIYNRHNLQTGIP
SRFSGSGSGTDYTLTINSLQPEDVATYFCYQYSDGYTFGAGTKLELK

Ат36 (INX433)
>VH **SEQ ID NO:107**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:108**

NIHLTQSPSLLSASVGDRVTLSCKGSQNINNYLAWFQQKFGETPKLLIYNRHNLQTGIP
SRFSGSGSGTDYTLTINSLQPEDVATYFCYQYSDGYTFGAGTKLELK

Ат37 (INX434)
>VH **SEQ ID NO:109**
QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWRHGTWYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:110**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат38 (INX435)

>VH **SEQ ID NO:111**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRFVHGTWYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:112**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат39 (INX436)
>VH **SEQ ID NO:113**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNKWIHGTWYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:114**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат40 (INX437)
>VH **SEQ ID NO:115**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYMMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:116**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат41 (INX438)

>VH **SEQ ID NO:117**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYLMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:118**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат42 (INX439)

>VH **SEQ ID NO:119**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWIHGTWYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:120**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат43 (INX440)

>VH **SEQ ID NO:121**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYWSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:122**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат44 (INX441)

>VH **SEQ ID NO:123**

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWVHGTWYSPGYYVMDA
WGQGTMVTVSS

>VL **SEQ ID NO:124**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат45 (INX442)

>VH **SEQ ID NO:125**

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWVQGWWYSPGYYVMD
AWGQGTMVTVSS

>VL **SEQ ID NO:126**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат46 (INX443)

>VH **SEQ ID NO:127**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYFSPGYYLMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:128**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат47 (INX444)
>VH **SEQ ID NO:129**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARKRWVHGTWYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:130**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат48 (INX445)
>VH **SEQ ID NO:131**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWMHGTWYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:132**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат49 (INX446)
>VH **SEQ ID NO:133**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARERWVHGTYYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:134**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат50 (INX447)
>VH **SEQ ID NO:135**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWVQGTYYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:136**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат51 (INX448)
>VH **SEQ ID NO:137**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWVHGTWYSPGYYVMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:138**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат52 (INX449)
>VH **SEQ ID NO:139**

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWVQGSYYSPGYYVMDA
WGQGTMVTVSS

>VL **SEQ ID NO:140**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат53 (INX450)
>VH **SEQ ID NO:141**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRFVHGTWYSPGYYLMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:142**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат54 (INX451)
>VH **SEQ ID NO:143**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWIHGTWYSPGYYLMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:144**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат55 (INX452)

>VH **SEQ ID NO:145**

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWVHGTWYSPGYYLMDA
WGQGTMVTVSS

>VL **SEQ ID NO:146**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат56 (INX453)

>VH **SEQ ID NO:147**

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWVQGWWYSPGYYLMD
AWGQGTMVTVSS

>VL **SEQ ID NO:148**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат57 (INX454)

>VH **SEQ ID NO:149**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWMHGTWYSPGYYLMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:150**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат58 (INX455)

>VH **SEQ ID NO:151**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARERWVHGTYFSPGYYLMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:152**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат59 (INX456)

>VH **SEQ ID NO:153**

QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWVHGTWYSPGYYLMDA
WGQGTLVTVSS

>VL **SEQ ID NO:154**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат60 (INX457)

>VH **SEQ ID NO:155**

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTE
YNPSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWVQGSYYSPGYYLMDA
WGQGTMVTVSS

>VL **SEQ ID NO: 156**

DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVA
SRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK

Ат61 (MCT1 3303 A07 или LM-183)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 161)
GFDFSNY

CDR2-HC (SEQ ID NO: 162)
GDSASY

CDR3-HC (SEQ ID NO: 163)
ASEGSYWYYEAGGIDT

Белок HC (SEQ ID NO: 164)

AVTLDESGGGLQTPGGTLSLVCKASGFDFSNYEMLWVRQAPGKGLEYVAGIGDSASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNGLRAEDTGTYYCTKASEGSYWYYEAGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 165)

ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGA
GGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAACTACGAAA
TGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCGCTGGTATTG
GCGACAGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCA
TCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGAGGCTGCAGCTGAACGGCCTCAGGG
CTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCACCAAAGCTTCCGAGGGTTCCTACTGGTA
TTATGAAGCTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 166)

SGGGGSYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 167)

DNDKRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 168)

GSAGNSGA

Белок LC (SEQ ID NO: 169)

ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGGGSYGWYQQKSPGSAPVTVIYDNDKRPSDIPSRFS
GSKSGSTATLTITGVRAEDEAVYYCGSAGNSGAFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 170)

GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGGAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTGGTGGCAGCTATGGCTGGTATCAGCAGAAGTCACCTGGCA
GTGCCCCTGTCACTGTGATCTATGACAACGACAAGAGACCCTCGGACATCCCTTCA
CGATTCTCCGGTTCCAAGTCCGGCTCCACAGCCACATTAACCATCACTGGGGTTC
GAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTACTGTGGCAGTGCAGGCAATAGTGGTGCATT
TGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

Ат62 (LM-185 или MCT1 3303 B04-1)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 171)
GFDFSNY

CDR2-HC (SEQ ID NO:172)
GDSASY

CDR3-HC (SEQ ID NO:173)
ASEGSYWYYEAGGIDT

Белок HC (SEQ ID NO: 174)
AVTLDESGGGLQTPGGTLSLVCKASGFDFSNYEMLWVRQAPGKGLEYVAGIGDSASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNGLRAEDTGTYYCTKASEGSYWYYEAGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 175)
ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGA
GGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAACTACGAAA
TGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCGCTGGTATTG
GCGACAGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCA
TCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGAGGCTGCAGCTGAACGGCCTCAGGG
CTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCACCAAAGCTTCCGAGGGTTCCTACTGGTA
TTATGAAGCTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC (SEQ ID NO:176)
SGGSSYG

CDR2-LC (SEQ ID NO:177)
YNDKRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO:178)
GSRDSSGADL

Белок LC (SEQ ID NO: 179)

ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGSSYGWFQQKSPGSALVTLIYYNDKRPSNIPSRFSG
SKSGSTGILTISGVQAEDEAVYYCGSRDSSGADLFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 180)

GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGGAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGCAGCAGTTATGGCTGGTTCCAGCAGAAGTCTCCTGGCAGTG
CCCTTGTCACTCTGATCTATTACAACGACAAGAGACCCTCGAACATCCCTTCACGA
TTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACGGGCATTTTGACCATCTCTGGGGTCCAAG
CCGAGGACGAGGCTGTCTATTACTGTGGGAGCAGGGACAGCAGTGGTGCTGATCT
ATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

<u>Ат63</u> (LM-186 или MCT1 3308 B04-2)

CDR1-HC (SEQ ID NO:181)

GFSFSSR

CDR2-HC (SEQ ID NO:182)

DNDGGYP

CDR3-HC (SEQ ID NO:183)

GAYGGGWYAASSIDA

Белок HC (SEQ ID NO:184)

AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFSFSSRGMFWVRQAPGKGLEYVAGIDNDGG
YPNYGSAVKGRATISRDNRQSTVRLQLNNLRADDTGTYYCAKGAYGGGWYAASSIDA
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 185)

GTCACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCC
GGAGGAGGGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCTCCTTCAGCAGCCGG
GGCATGTTCTGGGTGCGACAGGCACCTGGCAAGGGGCTGGAATACGTTGCGGGT
ATTGATAATGATGGTGGTTACCCAAACTACGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCA
CCATCTCGAGGGACAACAGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCA
GGGCTGACGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAGGGTGCTTATGGTGGTGGTT

GGTATGCCGCTAGTAGCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCT
CCTCG

CDR1-LC (SEQ ID NO:186)
SGGVGQWYG

CDR2-LC (SEQ ID NO:187)
DNTNRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO:188)
ANTYSDGNDAP

Белок LC (SEQ ID NO: 189)
ALTQPSSVSANPGEAVKITCSGGVGQWYGWFQQKAPGSAPVTVIHDNTNRPSDIPSR
FSGSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCANTYSDGNDAPFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 190)
GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCGGGAGAAGCCGTCAAGATCA
CCTGCAGTGGAGGTGTCGGCCAGTGGTATGGCTGGTTCCAGCAGAAGGCACCTG
GCAGTGCCCCTGTCACTGTGATCCATGACAACACCAACAGACCCTCGGACATCCC
TTCACGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACGGGCACATTAACCATCACTGGG
GTCCAAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGCGAATACATACAGCGACGGTA
ATGATGCTCCATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

Ат64 (LM-188 или MCT1 3308 E08)

CDR1-HC (SEQ ID NO:191)
GFTFSSR

CDR2-HC (SEQ ID NO:192)
DNDGGYP

CDR3-HC (SEQ ID NO:193)
GAYGGGWYAASSIDA

Белок HC (SEQ ID NO: 194)

AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFTFSSRGMFWVRRAPGKGLEYVAGIDNDGG
YPNYGSAVKGRATISRDNRQSTVRLQLNNLRADDTGTYYCAKGAYGGGWYAASSIDA
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 195)

GTCACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCC
GGAGGAGGGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCACCTTCAGCAGCCGG
GGCATGTTCTGGGTGCGACGGGCACCTGGCAAGGGGCTGGAATACGTTGCGGGT
ATTGATAATGATGGTGGTTACCCAAACTACGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCA
CCATCTCGAGGGACAACAGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCA
GGGCTGACGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAGGGTGCTTATGGTGGTGGTT
GGTATGCCGCTAGTAGCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCT
CCTCG

CDR1-LC (SEQ ID NO:196)

SGGVGQWYG

CDR2-LC (SEQ ID NO:197)

DNTNRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO:198)

ANTYSDGNDAP

Белок LC (SEQ ID NO: 199)

ALTQPSSVSANPGEAVKITCSGGVGQWYGWFQQKAPGSAPVTVIYDNTNRPSDIPSR
FSGSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCANTYSDGNDAPFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 200)

GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCGGGAGAAGCCGTCAAGATCA
CCTGCAGTGGAGGTGTCGGCCAGTGGTATGGCTGGTTCCAGCAGAAGGCACCTG
GCAGTGCCCCTGTCACTGTGATCTATGACAACACCAACAGACCCTCGGACATCCC
TTCACGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACGGGCACATTAACCATCACTGGG
GTCCAAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGCGAATACATACAGCGACGGTA
ATGATGCTCCATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

Ат65 (LM-189 или MCT1 3308 G12)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 201)
GFSFSSR

CDR2-HC (SEQ ID NO: 202)
DNDGGYP

CDR3-HC (SEQ ID NO: 203)
GAYGGGWYAASSIDA

Белок HC (SEQ ID NO: 204)
AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFSFSSRGMFWVRQAPGKGLEYVAGIDNDGG
YPNYGSAVKGRATISRDNRQSTVRLQLNNLRADDTGTYYCAKGAYGGGWYAASSIDA
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 205)
GTCACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCC
GGAGGAGGGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCTCCTTCAGCAGCCGG
GGCATGTTCTGGGTGCGACAGGCACCTGGCAAGGGGCTGGAATACGTTGCGGGT
ATTGATAATGATGGTGGTTACCCAAACTACGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCA
CCATCTCGAGGGACAACAGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCA
GGGCTGACGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAGGGTGCTTATGGTGGTGGTT
GGTATGCCGCTAGTAGCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCT
CCTCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 206)
SGGGGGWYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 207)
DNTNRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 208)
ANTDSDGNDAP

Белок LC (SEQ ID NO: 209)

ALTQPSSVSANPGETVKITCSGGGGGWYGWYQQKSPGSAPVTVIYDNTNRPSDIPSR
FSGSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCANTDSDGNDAPFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 210)

GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCGAACCCGGGAGAAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTGGTGGCGGCTGGTATGGCTGGTATCAGCAGAAGTCTCCTG
GCAGTGCCCCTGTCACTGTGATCTATGACAACACCAACAGACCCTCGGACATCCC
TTCACGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACGGGCACATTAACCATCACTGGG
GTCCAAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGCGAATACAGACAGCGACGGTA
ATGATGCTCCATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

<u>Ат66</u> (LM-190 или MCT1 3308 H02)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 211)

GFSFSSR

CDR2-HC (SEQ ID NO: 212)

DNDGGYP

CDR3-HC (SEQ ID NO: 213)

GAYGGGWYAASSIDA

Белок HC (SEQ ID NO: 214)

AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFSFSSRGMFWVRQAPGKGLEYVAGIDNDGG
YPNYGSAVKGRATISRDNRQSTVRLQLNNLRADDTGTYYCAKGAYGGGWYAASSIDA
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 215)

TCCGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGG
GCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCTCCTTCAGCAGCCGGGGCATGTTC
TGGGTGCGACAGGCACCTGGCAAGGGGCTGGAATACGTTGCGGGTATTGATAATG
ATGGTGGTTACCCAAACTACGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGA
GGGACAACAGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGACG

ACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAGGGTGCTTATGGTGGTGGTTGGTATGCCGC
TAGTAGCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 216)
SGGVGQWYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 217)
DNTKRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 218)
ANTYSDGNDAP

Белок LC (SEQ ID NO: 219)
ALTQPSSVSANLGEAVKITCSGGVGQWYGWYQQKAPGSAPVTVIYDNTKRPSNIPSR
FSGSASGSTATLTITGVRAEDEAVYFCANTYSDGNDAPFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 220)
GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGAAGCCGTCAAGATCA
CCTGCAGTGGAGGTGTCGGCCAGTGGTATGGCTGGTACCAGCAGAAGGCACCTG
GCAGTGCCCCTGTCACTGTGATCTATGACAACACCAAGAGACCCTCAAACATCCCT
TCACGATTCTCCGGTTCCGCATCCGGCTCCACAGCCACACTAACCATCACTGGAG
TCCGAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGCGAATACATACAGCGACGGTAA
TGATGCTCCATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

Ат67 (LM-193 или MCT1 3310 A07)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 221)
GFDFSNY

CDR2-HC (SEQ ID NO: 222)
GDSASY

CDR3-HC (SEQ ID NO: 223)
ASEGSYWYYEAGGIDT

Белок HC (SEQ ID NO: 224)

AVTLDESGGGLQTPGGTLSLVCKASGFDFSNYEMLWVRQAPGKGLEYVAGIGDSASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNGLRAEDTGTYYCTKASEGSYWYYEAGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 225)

ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGA
GGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAACTACGAAA
TGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCGCTGGTATTG
GCGACAGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCA
TCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGAGGCTGCAGCTGAACGGCCTCAGGG
CTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCACCAAAGCTTCCGAGGGTTCCTACTGGTA
TTATGAAGCTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 226)

SGGSGSYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 227)

YNDKRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 228)

GSAGNSGA

Белок LC (SEQ ID NO: 229)

ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGSGSYGWFRQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFS
GSKSGSTATLTITGVRAEDEAVYFCGSAGNSGAFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 230)

GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGGAACAGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTAGTGGCAGCTATGGCTGGTTCCGGCAGAAGTCTCCTGGCA
GTGCCCCTGTCACTGTGATCTATTACAACGACAAGAGACCCTCGGACATCCCTTCA
CGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACAGCCACATTAACCATCACTGGGGTCC
GAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGTGCAGGCAACAGTGGTGCATT
TGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

Ат68 (LM-194 или MCT1 3310 B07-1)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 231)
GFDFSSY

CDR2-HC (SEQ ID NO: 232)
GDGASY

CDR3-HC (SEQ ID NO: 233)
ASEGSYWYYETGGIDT

Белок HC (SEQ ID NO: 234)
AVTLDESGGGLQTPGGTLSLVCKASGFDFSSYEMLWVRQAPGKGLAYVAGIGDGASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCAKASEGSYWYYETGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 235)
ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGA
GGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAGCTACGAAA
TGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGCATACGTCGCTGGTATCG
GCGACGGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGAGCCACCA
TCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGG
CTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAAGCTTCCGAGGGTTCCTACTGGTA
TTATGAAACTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 236)
SGGGGSYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 237)
YNDKRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 238)
GSAGNSGA

Белок LC (SEQ ID NO: 239)

ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGGGSYGWFQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFS
GSKSGSTATLTITGVRAEDEAVYFCGSAGNSGAFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 240)

GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGGAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTGGTGGCAGCTATGGCTGGTTCCAGCAGAAGTCTCCTGGCA
GTGCCCCTGTCACTGTGATCTATTACAACGACAAGAGACCCTCGGACATCCCTTCA
CGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACAGCCACATTAACCATCACTGGGGTCC
GAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGTGCAGGCAACAGTGGTGCATT
TGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

<u>Ат69</u> (LM-195 или MCT1 3310 B07-2)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 241)

GFDFSSY

CDR2-HC (SEQ ID NO: 242)

GDGASY

CDR3-HC (SEQ ID NO: 243)

ASEGSYWYYETGGIDT

Белок HC (SEQ ID NO: 244)

AVTLDESGGGLQTPGGTLSLVCKASGFDFSSYEMLWVRQAPGKGLAYVAGIGDGASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNGLRAEDTGTYYCAKASEGSYWYYETGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 245)

ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGA
GGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAGCTACGAAA
TGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGCATACGTCGCTGGTATCG
GCGACGGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCA
TCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGAGGCTGCAGCTGAACGGCCTCAGGG

CTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAAGCTTCCGAGGGTTCCTACTGGTA
TTATGAAACTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 246)
SGGGGSYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 247)
YNDKRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 248)
GSAGNSGA

Белок LC (SEQ ID NO: 249)
ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGGGSYGWFQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFS
GSKSGSTATLTITGVRAEDEAVYFCGSAGNSGAFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 250)
GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGGAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTGGTGGCAGCTATGGCTGGTTCCAGCAGAAGTCTCCTGGCA
GTGCCCCTGTCACTGTGATCTATTACAACGACAAGAGACCCTCGGACATCCCTTCA
CGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACAGCCACATTAACCATCACTGGGGTCC
GAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGTGCAGGCAACAGTGGTGCATT
TGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

<u>Ат70</u> (LM-197 или MCT1 3310 E01)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 251)
GFDFSSY

CDR2-HC (SEQ ID NO: 252)
GNSASY

CDR3-HC (SEQ ID NO: 253)
PSDGSYWYYEAGGIDT

Белок HC (SEQ ID NO: 254)

AVTLDESGGGLQTPGGTLSLVCKASGFDFSSYEMLWVRQAPGKGLEFVAGIGNSASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSTVRLKLNNLRAEDTGTYYCAKPSDGSYWYYEAGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 255)

ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGA
GGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAGCTACGAAA
TGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATTCGTCGCTGGTATTG
GCAACAGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCA
TCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACAGTGAGGCTGAAGCTGAACAACCTCAGGG
CTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAACCTTCCGATGGTTCCTACTGGTA
TTATGAAGCTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 256)

SGGGGSYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 257)

DNDKRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 258)

GSAGNSGA

Белок LC (SEQ ID NO: 259)

ALTQPSSVSANPGGTVKITCSGGGGSYGWYQQKSPGSAPVTVIYDNDKRPSDIPSRF
SGSKSGSTATLTITGVRAEDEAVYYCGSAGNSGAFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 260)

GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCGGGAGGAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTGGTGGCAGCTATGGCTGGTATCAGCAGAAGTCACCTGGCA
GTGCCCCTGTCACTGTGATCTATGACAACGACAAGAGACCCTCGGACATCCCTTCA
CGATTCTCCGGTTCCAAGTCCGGCTCCACAGCCACATTAACCATCACTGGGGTTC

GAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTACTGTGGCAGTGCAGGCAATAGTGGTGCATT
TGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

A71 (LM-198 или MCT1 3310 E03)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 261)
GFDFSNY

CDR2-HC (SEQ ID NO: 262)
GDSASY

CDR3-HC (SEQ ID NO: 263)
ASEGSYWYYEAGGIDT

Белок HC (SEQ ID NO: 264)
AVTLDESGGGLQTPGGTLSLVCKASGFDFSNYEMLWVRQAPGKGLEYVAGIGDSASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSALRLQLNGLRAEDTGTYYCTKASEGSYWYYEAGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 265)
ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGA
GGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAACTACGAAA
TGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCGCTGGTATTG
GCGACAGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCA
TCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCGCACTGAGGCTGCAGCTGAACGGCCTCAGGG
CTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCACCAAAGCTTCCGAGGGTTCCTACTGGTA
TTATGAAGCTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 266)
SGGGGSYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 267)
YNDKRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 268)
GSGDSSGGI

Белок LC (SEQ ID NO: 269)
ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGGGSYGWFQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFS
GSKSGSTATLTITGVQVDDEAVYFCGSGDSSGGIFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 270)
GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGGAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTGGTGGCAGCTATGGCTGGTTCCAGCAGAAGTCTCCTGGCA
GTGCCCCTGTCACTGTGATCTATTACAACGACAAGAGACCCTCGGACATCCCTTCA
CGATTCTCCGGCTCCAAATCCGGCTCCACGGCCACATTAACCATCACTGGGGTCC
AAGTCGACGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGTGGAGACAGCAGTGGTGGTAT
ATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

<u>Ат72</u> (LM-199 или MCT1 3310 E04)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 271)
GFDFSNY

CDR2-HC (SEQ ID NO: 272)
GDSASY

CDR3-HC (SEQ ID NO: 273)
ASEGSYWYYEAGGIDT

Белок HC (SEQ ID NO: 274)
AVTLDESGGGLRTPGGTLSLVCKASGFDFSNYEMLWVRQAPGKGLEYVAGIGDSASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNGLRAEDTGTYYCTKASEGSYWYYEAGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 275)
ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCGGACGCCCGG
AGGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAACTACGAA

ATGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCGCTGGTATT
GGCGACAGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACC
ATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGAGGCTGCAGCTGAACGGCCTCAGG
GCTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCACCAAAGCTTCCGAGGGTTCCTACTGGT
ATTATGAAGCTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTC
CTCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 276)
SGGGGSYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 277)
YNDKRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 278)
GSAGNSGA

Белок LC (SEQ ID NO: 279)
ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGGGSYGWFQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFS
GSKSGSTGTLTITGVRAEDEAVYFCGSAGNSGAFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 280)
GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGGAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTGGTGGCAGCTATGGCTGGTTCCAGCAGAAGTCTCCTGGCA
GTGCCCCTGTCACTGTGATCTATTACAACGACAAGAGACCCTCAGACATCCCTTCA
CGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACGGGCACATTAACCATCACTGGGGTCC
GAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGTGCAGGCAACAGTGGTGCATT
TGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

Ат73 (LM-201 или MCT1 3310 H09)
CDR1-HC (SEQ ID NO: 281)
GFDFSSY

CDR2-HC (SEQ ID NO: 282)
GDGASY

CDR3-HC (SEQ ID NO: 283)

ASEGSYWYYETGGIDT

Белок HC (SEQ ID NO: 284)

AVTLDESGGGLQTPGGTLSLVCKASGFDFSSYEMLWVRQAPGKGLAYVAGIGDGASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCAKASEGSYWYYETGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 285)

ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGA
GGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAGCTACGAAA
TGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGCATACGTCGCTGGTATCG
GCGACGGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGAGCCACCA
TCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGG
CTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAAGCTTCCGAGGGTTCCTACTGGTA
TTATGAAACTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 286)

SGGGGSYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 287)

YNDKRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 288)

GSAGNSGA

Белок LC (SEQ ID NO: 289)

ALTQPSSVSANLGETVKITCSGGGGSYGWFQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFS
GSKSGSTATLTITGVRAEDEAVYFCGSAGNSGAFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 290)

GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTAGGAGAAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTGGTGGCAGCTATGGCTGGTTCCAGCAGAAGTCTCCTGGCA
GTGCCCCTGTCACTGTGATCTATTACAACGACAAGAGACCCTCGGACATCCCTTCA

CGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACAGCCACATTAACCATCACTGGGGTCC
GAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGTGCAGGCAACAGTGGTGCATT
TGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

<u>Ат74</u> (LM-202 или MCT1 3310 H12)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 291)
GFDFSSY

CDR2-HC (SEQ ID NO: 292)
GDGASY

CDR3-HC (SEQ ID NO: 293)
ASEGSYWYYETGGIDT

Белок HC (SEQ ID NO: 294)
AVTLDESGGGLQTPGGTLSLVCKASGFDFSSYEMLWVRQAPGKGLAYVAGIGDGASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCAKASEGSYWYYETGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 295)
ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGA
GGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAGCTACGAAA
TGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGCATACGTCGCTGGTATCG
GCGACGGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGAGCCACCA
TCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGG
CTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAAGCTTCCGAGGGTTCCTACTGGTA
TTATGAAACTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 296)
SGGGGSYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 297)
YNDKRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 298)
GSAGNSGA

Белок LC (SEQ ID NO: 299)
ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGGGSYGWFQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFS
GSKSGSTATLTITGVRAEDEAVYFCGSAGNSGAFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 300)
GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGGAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTGGTGGCAGCTATGGCTGGTTCCAGCAGAAGTCTCCTGGCA
GTGCCCCTGTCACTGTGATCTATTACAACGACAAGAGACCCTCGGACATCCCTTCA
CGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACAGCCACATTAACCATCACTGGGGTCC
GAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGTGCAGGCAACAGTGGTGCATT
TGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

<u>Ат75</u> (LM-203 или MCT1 3311 A07)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 301)
GFDFSNY

CDR2-HC (SEQ ID NO: 302)
GDSASY

CDR3-HC (SEQ ID NO: 303)
ASEGSYWYYEAGGIDT

Белок HC (SEQ ID NO: 304)
AVTLDESGGGLQTPGGTLSLVCKASGFDFSNYEMLWVRQAPGKGLEYVAGIGDSASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNGLRAEDTGTYYCTKASEGSYWYYEAGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 305)
ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGA
GGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAACTACGAAA

TGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCGCTGGTATTG
GCGACAGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCA
TCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGAGGCTGCAGCTGAACGGCCTCAGGG
CTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCACCAAAGCTTCCGAGGGTTCCTACTGGTA
TTATGAAGCTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 306)
SGGSGSYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 307)
ANTNRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 308)
GSADSTGAGM

Белок LC (SEQ ID NO: 309)
ALTQPSSVSLNLGGTVKITCSGGSGSYGWFQQKSPGSAPVTLIYANTNRPSDIPSRFS
GSKSGSTNTLTITGVQAEDEAIYYCGSADSTGAGMFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 310)
GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCACTAAACCTGGGAGGAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTAGTGGCAGCTACGGCTGGTTCCAGCAGAAGTCACCTGGCA
GTGCCCCTGTCACTCTGATCTATGCTAATACCAACAGACCCTCAGACATCCCTTCA
CGATTCTCCGGTTCCAAATCTGGCTCCACAAACACATTAACCATCACTGGGGTCCA
AGCCGAGGACGAGGCTATCTATTACTGTGGGAGTGCAGACAGCACTGGTGCTGGT
ATGTTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

Ат76 (LM-204 или MCT1 3311 B11)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 311)
GFDFSNY

CDR2-HC (SEQ ID NO: 312)
GDSASY

CDR3-HC (SEQ ID NO: 313)

ASEGSYWYYEAGGIDT

Белок HC (SEQ ID NO: 314)

AVTLDESGGGLQTPGGTLSLVCKASGFDFSNYEMLWVRQAPGKGLEYVAGIGDSASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNGLRAEDTGTYYCTKASEGSYWYYEAGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 315)

ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGA
GGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAACTACGAAA
TGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCGCTGGTATTG
GCGACAGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCA
TCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGAGGCTGCAGCTGAACGGCCTCAGGG
CTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCACCAAAGCTTCCGAGGGTTCCTACTGGTA
TTATGAAGCTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 316)

SGGGGSYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 317)

YNDKRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 318)

GSAGNSGA

Белок LC (SEQ ID NO: 319)

ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGGGSYGWFQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFS
GSKSGSTGTLTITGVRAEDEAVYFCGSAGNSGAFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 320)

GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGGAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTGGTGGCAGCTATGGCTGGTTCCAGCAGAAGTCTCCTGGCA

GTGCCCCTGTCACTGTGATCTATTACAACGACAAGAGACCCTCGGACATCCCTTCA
CGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACGGGCACATTAACCATCACTGGGGTCC
GAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGTGCAGGCAACAGTGGTGCATT
TGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

Ат77 (LM-205 или MCT1 3311 C05)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 321)
GFDFSNY

CDR2-HC (SEQ ID NO: 322)
GDSASY

CDR3-HC (SEQ ID NO: 323)
ASEGSYWYYEAGGIDT

Белок HC (SEQ ID NO: 324)
AVTLDESGGGLRTPGGTLSLVCKASGFDFSNYEMLWVRQAPGKGLEYVAGIGDSASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNGLRAEDTGTYYCTKASEGSYWYYEAGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 325)
ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCGGACGCCCGG
AGGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAACTACGAA
ATGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCGCTGGTATT
GGCGACAGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACC
ATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGAGGCTGCAGCTGAACGGCCTCAGG
GCTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCACCAAAGCTTCCGAGGGTTCCTACTGGT
ATTATGAAGCTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTC
CTCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 326)
SGGGGSYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 327)

YNDKRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 328)
GSAGNSGA

Белок LC (SEQ ID NO: 329)
ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGGGSYGWFQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFS
GSKSGSTGTLTITGVRAEDEAVYFCGSAGNSGAFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 330)
GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGGAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTGGTGGCAGCTATGGCTGGTTCCAGCAGAAGTCTCCTGGCA
GTGCCCCTGTCACTGTGATCTATTACAACGACAAGAGACCCTCAGACATCCCTTCA
CGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACGGGCACATTAACCATCACTGGGGTCC
GAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGTGCAGGCAACAGTGGTGCATT
TGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

<u>Ат78</u> (LM-206 или MCT1 3311 F10)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 331)
GFDFSNY

CDR2-HC (SEQ ID NO: 332)
GDSASY

CDR3-HC (SEQ ID NO: 333)
ASEGSYWYYEAGGIDT

Белок HC (SEQ ID NO: 334)
AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFDFSNYEMLWVRQAPGKGLEYVAGIGDSASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNGLRAEDTGTYYCTKASEGSYWYYEAGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 335)

ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGA
GGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAACTACGAAA
TGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCGCTGGTATTG
GCGACAGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCA
TCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGAGGCTGCAGCTGAACGGCCTCAGGG
CTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCACCAAAGCTTCCGAGGGTTCCTACTGGTA
TTATGAAGCTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 336)
SGGGGSYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 337)
YNDKRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 338)
GSAGNSGA

Белок LC (SEQ ID NO: 339)
ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGGGSYGWFQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFS
GSKSGSTGTLTITGVRAEDEAVYFCGSAGNSGAFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 340)
GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGGAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTGGTGGCAGCTATGGCTGGTTCCAGCAGAAGTCTCCTGGCA
GTGCCCCTGTCACTGTGATCTATTACAACGACAAGAGACCCTCGGACATCCCTTCA
CGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACGGGCACATTAACCATCACTGGGGTCC
GAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGTGCAGGCAACAGTGGTGCATT
TGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

Ат79 (LM-207 или MCT1 3311 G09)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 341)
GFDFSNY

CDR2-HC (SEQ ID NO: 342)

GDSASY

CDR3-HC (SEQ ID NO: 343)

ASEGSYWYYEAGGIDT

Белок HC (SEQ ID NO: 344)

AVTLDESGGGLQTPGGTLSLVCKASGFDFSNYEMLWVRQAPGKGLEYVAGIGDSASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNGLRAEDTGTYYCTKASEGSYWYYEAGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 345)

ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGA
GGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAACTACGAAA
TGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCGCTGGTATTG
GCGACAGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCA
TCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGAGGCTGCAGCTGAACGGCCTCAGGG
CTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCACCAAAGCTTCCGAGGGTTCCTACTGGTA
TTATGAAGCTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 346)

SGGGGSYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 347)

YNDKRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 348)

GSAGNSGA

Белок LC (SEQ ID NO: 349)

ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGGGSYGWFQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFS
GSKSGSTGTLTITGVRAEDEAVYFCGSAGNSGAFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 350)

GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGGAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTGGTGGCAGCTATGGCTGGTTCCAGCAGAAGTCTCCTGGCA
GTGCCCCTGTCACTGTGATCTATTACAACGACAAGAGACCCTCGGACATCCCTTCA
CGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACGGGCACATTAACCATCACTGGGGTCC
GAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGTGCAGGCAACAGTGGTGCATT
TGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

<u>Ат80</u> (LM-208 или MCT1 3312 H10)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 351)
GFSFSSR

CDR2-HC (SEQ ID NO: 352)
DNDGGY

CDR3-HC (SEQ ID NO: 353)
GAYGGGWYAASSIDA

Белок HC (SEQ ID NO: 354)
AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFSFSSRGMFWVRQAPGKGLEYVAGIDNDGG
YPNYGSAVKGRATISRDNRQSTVRLQLNNLRADDTGTYYCAKGAYGGGWYAASSIDA
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 355)
GTCACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCC
GGAGGAGGGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCTCCTTCAGCAGCCGG
GGCATGTTCTGGGTGCGACAGGCACCTGGCAAGGGGCTGGAATACGTTGCGGGT
ATTGATAATGATGGTGGTTACCCAAACTACGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCA
CCATCTCGAGGGACAACAGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCA
GGGCTGACGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAGGGTGCTTATGGTGGTGGTT
GGTATGCCGCTAGTAGCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCT
CCTCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 356)
SGGGSSSYYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 357)
DNNKRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 358)
ANTYSDGNDAP

Белок LC (SEQ ID NO: 359)
ALTQPSSVSAKSGETVKITCSGGGSSSYYGWYQQKSPGSAPVTVIYDNNKRPSNIPSQ
FSGSKSGSTSTLTITGVQADDEAVYFCANTYSDGNDAPFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 360)
GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAAGTCAGGAGAAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTGGTAGCAGCAGCTACTATGGCTGGTATCAGCAGAAGTCACC
TGGCAGTGCCCCTGTCACTGTGATCTATGACAACAACAAGAGACCCTCGAACATCC
CTTCACAATTCTCCGGTTCCAAATCTGGCTCCACAAGCACATTAACCATCACTGGG
GTCCAAGCCGACGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGCGAATACATACAGCGACGGTA
ATGATGCTCCATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

<u>Ат81</u> (LM-209 или MCT1 3313 A11)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 361)
GFSFSSR

CDR2-HC (SEQ ID NO: 362)
DNDGGY

CDR3-HC (SEQ ID NO: 363)
GAYGGGWYAASSIDA

Белок HC (SEQ ID NO: 364)
AVTLDESGGGLQTPGGALSLICKASGFSFSSRGMFWVRQAPGKGLEYVAGIDNDGGY
PNYGSAVKGRATISRDNRQSTVRLQLNNLRADDTGTYYCAKGAYGGGWYAASSIDA
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 365)

GTCACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCC
GGAGGAGCTCTCAGCCTCATCTGCAAGGCCTCCGGGTTCTCCTTCAGCAGCCGG
GGCATGTTCTGGGTGCGACAGGCACCTGGCAAGGGGCTGGAATACGTTGCGGGT
ATTGATAATGATGGTGGTTACCCAAACTACGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCA
CCATCTCGAGGGACAACAGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCA
GGGCTGACGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAGGGTGCTTATGGTGGTGGTT
GGTATGCCGCTAGTAGCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCT
CCTCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 366)

SGGVGQWYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 367)

DNTNRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 368)

ANTYSDGNDAP

Белок LC (SEQ ID NO: 369)

ALTQPSSVSANPGEAVKITCSGGVGQWYGWYQQKAPGSAPVTVIYDNTNRPSDIPSR
FSGSKSGSTNTLTITGVQAEDEAVYFCANTYSDGNDAPFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 370)

GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCGGGAGAAGCCGTCAAGATCA
CCTGCAGTGGAGGTGTCGGCCAGTGGTATGGCTGGTACCAGCAGAAGGCACCTG
GCAGTGCCCCTGTCACTGTGATCTATGACAACACCAACAGACCCTCGGACATCCC
TTCACGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACAAACACATTAACCATCACTGGGG
TCCAAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGCGAATACATACAGCGACGGTAA
TGATGCTCCATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

<u>Ат82 (</u> LM-210 или MCT1 3313 B10)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 371)

GFSFSSR

CDR2-HC (SEQ ID NO: 372)

DNDGGY

CDR3-HC (SEQ ID NO: 373)

GAYGGGWYAASSIDA

Белок HC (SEQ ID NO: 374)

AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFSFSSRGMFWVRQAPGKGLEYVAGIDNDGG
YPNYGSAVKGRATISRDNRQSTVRLQLNNLRADDTGTYYCAKGAYGGGWYAASSIDA
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 375)

GTCACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCC
GGAGGAGGGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCTCCTTCAGCAGCCGG
GGCATGTTCTGGGTGCGACAGGCACCTGGCAAGGGGCTGGAATACGTTGCGGGT
ATTGATAATGATGGTGGTTACCCAAACTACGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCA
CCATCTCGAGGGACAACAGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAATAACCTCAG
GGCTGACGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAGGGTGCTTATGGTGGTGGTTG
GTATGCCGCTAGTAGCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 376)

SGGVGQWYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 377)

DNANRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 378)

ANTYSDGNDAP

Белок LC (SEQ ID NO: 379)

ALTQPSSVSANPGEAVKITCSGGVGQWYGWYQQKAPGSAPVTVIYDNANRPSDIPSR
FSGSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCANTYSDGNDAPFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 380)

GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCGGGAGAAGCCGTCAAGATCA
CCTGCAGTGGAGGTGTCGGCCAGTGGTATGGCTGGTACCAGCAGAAGGCACCTG
GCAGTGCCCCTGTCACTGTGATCTATGACAACGCCAACAGACCCTCGGACATCCC
TTCACGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACGGGCACATTAACCATCACTGGG
GTCCAAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGCGAATACATACAGCGACGGTA
ATGATGCTCCATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

Ат83 (LM-211 или MCT1 3309 B01)

CDR1-HC (SEQ ID NO: 381)

GFSFSSR

CDR2-HC (SEQ ID NO: 382)

DNDGGY

CDR3-HC (SEQ ID NO: 383)

GAYGGGWYAASSIDA

Белок HC (SEQ ID NO: 384)

AVTLDESGGGLQTPGGALSLICKASGFSFSSRGMFWVRQAPGKGLEYVAGIDNDGGY
PNYGSAVKGRATISRDNRQSTVRLQLNNLRADDTGTYYCAKGAYGGGWYAASSIDA
WGHGTEVIVSS

ДНК HC (SEQ ID NO: 385)

GTCACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCC
GGAGGAGCTCTCAGCCTCATCTGCAAGGCCTCCGGGTTCTCCTTCAGCAGCCGG
GGCATGTTCTGGGTGCGACAGGCACCTGGCAAGGGGCTGGAATACGTTGCGGGT
ATTGATAATGATGGTGGTTACCCAAACTACGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCA
CCATCTCGAGGGACAACAGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCA
GGGCTGACGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAGGGTGCTTATGGTGGTGGTT
GGTATGCCGCTAGTAGCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCT
CCTCG

CDR1-LC (SEQ ID NO: 386)

SGGVGQWYG

CDR2-LC (SEQ ID NO: 387)
DNTNRPS

CDR3-LC (SEQ ID NO: 388)
ANTYSDGNDAP

Белок LC (SEQ ID NO: 389)
ALTQPSSVSANPGEAVKITCSGGVGQWYGWYQQKAPGSAPVTVIYDNTNRPSDIPSR
FSGSKSGSTNTLTITGVQAEDEAVYFCANTYSDGNDAPFGAGTTLTVL

ДНК LC (SEQ ID NO: 390)
GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCGGGAGAAGCCGTCAAGATCA
CCTGCAGTGGAGGTGTCGGCCAGTGGTATGGCTGGTACCAGCAGAAGGCACCTG
GCAGTGCCCCTGTCACTGTGATCTATGACAACACCAACAGACCCTCGGACATCCC
TTCACGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACAAACACATTAACCATCACTGGGG
TCCAAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGCGAATACATACAGCGACGGTAA
TGATGCTCCATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

<u>Ат84</u> (LM-184 или MCT1 3303 C03)

CDR1-HC GFDFSNY **(SEQ ID NO: 391)**

CDR2-HC GDSASY **(SEQ ID NO: 392)**

CDR3-HC ASEGSYWYYEAGGIDT **(SEQ ID NO: 393)**

Белок HC **(SEQ ID NO: 394)**
AVTLDESGGGLQTPGGTLSLVCKASGFDFSNYEMLWVRQAPGKGLEYVAGIGDSASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNGLRAEDTGTYYCTKASEGSYWYYEAGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC **(SEQ ID NO: 395)**

ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGA
GGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAACTACGAAA
TGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCGCTGGTATTG
GCGACAGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCA
TCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGAGGCTGCAGCTGAACGGCCTCAGGG
CTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCACCAAAGCTTCCGAGGGTTCCTACTGGTA
TTATGAAGCTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC SGGTYSYG **(SEQ ID NO: 396)**

CDR2-LC QNDKRPS **(SEQ ID NO: 397)**

CDR3-LC GSGDTTGGI **(SEQ ID NO: 398)**

Белок LC **(SEQ ID NO: 399)**

ALTQPSSVSANPGETVKITCSGGTYSYGWFQQKSPGSAPVTVIYQNDKRPSDIPSRFS
GSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCGSGDTTGGIFGAGTTLTVL

ДНК LC **(SEQ ID NO: 400)**

GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCAGGAGAAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCTGGGGGCACCTATAGTTATGGCTGGTTCCAGCAGAAGTCTCCTGGCAG
TGCCCCTGTCACTGTGATCTATCAAAACGACAAGAGACCCTCGGACATCCCTTCAC
GATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACGGGCACATTAACCATCACTGGGGTCCA
AGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGTGGAGACACCACCGGTGGTATA
TTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

<u>Ат85</u> (LM-187 или MCT1 3308 B07)

CDR1-HC GFGFTNY **(SEQ ID NO: 401)**

CDR2-HC SSGGAY **(SEQ ID NO: 402)**

CDR3-HC APCGSWCGWGYTGVDNIDA **(SEQ ID NO: 403)**

Белок HC **(SEQ ID NO: 404)**

AVTLDESGGGLQTPGGLVSLVCKASGFGFTNYEIHWVRQAPGKGLEWVGFVSSGGA
YADYAPAVKGRATITRDNGQSTVRLQLVNLRAEDTGTYYCTRAPCGSWCGWGYTGV
DNIDAWGHGTEVIVSS

ДНК HC **(SEQ ID NO: 405)**

GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGACTGGT
CAGTCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGGCTTCACCAATTATGAGATCCACTGG
GTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCGGTTTTGTTAGTAGTGGT
GGTGCTTACGCAGATTACGCGCCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCACGAGG
GACAACGGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGGTCAACCTCAGGGCGGAGGAC
ACCGGCACCTACTACTGCACCAGAGCTCCTTGTGGTAGTTGGTGTGGTTGGGGTT
ATACTGGTGTCGATAACATCGACGCGTGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTC
CTCG

CDR1-LC SGGGRGSHYG **(SEQ ID NO: 406)**

CDR2-LC ANNQRPS **(SEQ ID NO: 407)**

CDR3-LC GGYDSGAT **(SEQ ID NO: 408)**

Белок LC **(SEQ ID NO: 409)**

ALTQPSSVSANPGGIVKITCSGGGRGSHYGWYQQKSPGSAPVTLIYANNQRPSDIPSR
FSGSESGSTATLTITGVQAEDEAVYFCGGYDSGATFGAGTTLTVL

ДНК LC **(SEQ ID NO: 410)**
GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCGAACCCAGGAGGAATCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTGGTCGCGGCAGCCACTATGGCTGGTATCAGCAGAAGTCTC
CTGGCAGTGCCCCTGTCACTCTGATCTATGCTAACAACCAGAGACCCTCGGACAT
CCCTTCGCGATTCTCCGGTTCCGAATCCGGCTCCACGGCCACATTAACCATCACT

GGGGTCCAAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGTGGCTACGACAGCGGT
GCTACATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

<u>Ат86</u> (LM-191 или MCT1 3310 A01)

CDR1-HC GFDFSNY **(SEQ ID NO: 411)**

CDR2-HC GDSASY **(SEQ ID NO: 412)**

CDR3-HC ASEGSYWYYEAGGIDT **(SEQ ID NO: 413)**

Белок HC **(SEQ ID NO: 414)**

AVTLDESGGGLQTPGGTLSLVCKASGFDFSNYEMLWVRQAPGKGLEYVAGIGDSASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNGLRAEDTGTYYCTKASEGSYWYYEAGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC **(SEQ ID NO: 415)**

ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGA
GGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAACTACGAAA
TGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCGCTGGTATTG
GCGACAGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCA
TCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGAGGCTGCAGCTGAACGGCCTCAGGG
CTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCACCAAAGCTTCCGAGGGTTCCTACTGGTA
TTATGAAGCTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC SGSSGSYG **(SEQ ID NO: 416)**

CDR2-LC YNDKRPS **(SEQ ID NO: 417)**

CDR3-LC GSYGSTDAAI **(SEQ ID NO: 418)**

Белок LC **(SEQ ID NO: 419)**

ALTQPSSVSASPGGTVKITCSGSSGSYGWYQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFS
GSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCGSYGSTDAAIFGAGTTLTVL
ДНК LC **(SEQ ID NO: 420)**

GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCCGCGAGCCCAGGAGGAACCGTCAAGATC
ACCTGCTCCGGGAGTAGTGGCAGCTATGGCTGGTATCAGCAGAAGTCACCTGGCA
GTGCCCCTGTCACTGTGATCTATTACAACGACAAGAGACCCTCGGACATCCCTTCA
CGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACGGGCACATTAACCATCACTGGGGTCC
AAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGCTACGGCAGCACTGATGCTGC
TATATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

<u>Ат87</u> (LM-192 или MCT1 3310 A02-1)

CDR1-HC GFDFSNY **(SEQ ID NO: 421)**

CDR2-HC GDSASY **(SEQ ID NO: 422)**

CDR3-HC ASEGSYWYYEAGGIDT **(SEQ ID NO: 423)**

Белок HC **(SEQ ID NO: 424)**
AVTLDESGGGLQTPGGTLSLVCKASGFDFSNYEMLWVRQAPGKGLEYVAGIGDSASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNGLRAEDTGTYYCTKASEGSYWYYEAGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC **(SEQ ID NO: 425)**
ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGA
GGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAACTACGAAA
TGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCGCTGGTATTG
GCGACAGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCA
TCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGAGGCTGCAGCTGAACGGCCTCAGGG
CTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCACCAAAGCTTCCGAGGGTTCCTACTGGTA
TTATGAAGCTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC SGGYSSYG **(SEQ ID NO: 426)**

CDR2-LC YNAKRPS **(SEQ ID NO: 427)**

CDR3-LC GTADRSSTAL **(SEQ ID NO: 428)**

Белок LC **(SEQ ID NO: 429)**

ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGYSSYGWYQQKSPGSAPVTLIYYNAKRPSNIPSRFS
GSKSGSTATLTITGVQAEDEAVYFCGTADRSSTALFGAGTTLTVL
ДНК LC **(SEQ ID NO: 430)**

GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGGAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTTACAGCAGCTATGGCTGGTATCAGCAGAAGTCTCCTGGCAG
TGCTCCTGTCACTCTGATCTATTACAACGCCAAGAGACCCTCGAACATCCCTTCAC
GATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACAGCCACATTAACCATCACTGGGGTCCAA
GCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGACTGCAGACAGGAGCAGTACTGCTT
TATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

<u>Ат88</u> (LM-196 или MCT1 3310 C01)

CDR1-HC GFDFSSY **(SEQ ID NO: 431)**

CDR2-HC GDGASY **(SEQ ID NO: 432)**

CDR3-HC ASEGSYWYYETGGIDT **(SEQ ID NO: 433)**

Белок HC **(SEQ ID NO: 434)**

AVTLDESGGGLQTPGGTLSLVCKASGFDFSSYEMLWVRQAPGKGLAYVAGIGDGASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCAKASEGSYWYYETGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC **(SEQ ID NO: 435)**

ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGA
GGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAGCTACGAAA
TGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGCATACGTCGCTGGTATCG
GCGACGGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGAGCCACCA
TCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGG
CTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAAGCTTCCGAGGGTTCCTACTGGTA
TTATGAAACTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC SGGSGSYG **(SEQ ID NO: 436)**

CDR2-LC YNDKRPS **(SEQ ID NO: 437)**

CDR3-LC GSGDRSYDGM **(SEQ ID NO: 438)**

Белок LC **(SEQ ID NO: 439)**
ALTQPSSVSANPGETVEITCSGGSGSYGWYQQKSPGSAPVTVIHYNDKRPSDIPSRFS
GSASGSTATLTITGVQVEDEAVYFCGSGDRSYDGMFGAGTTLTVL

ДНК LC **(SEQ ID NO: 440)**
GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCGGGAGAAACCGTCGAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTAGTGGCAGCTACGGCTGGTACCAGCAGAAGTCTCCTGGCA
GTGCCCCTGTCACTGTGATCCATTACAACGACAAGAGACCCTCGGACATCCCTTCA
CGATTCTCCGGTTCCGCATCCGGCTCCACAGCCACATTAACCATCACTGGGGTCC
AAGTCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGTGGAGACAGGAGTTATGATGG
TATGTTCGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

<u>Ат89</u> (LM-200 или MCT1 3310 F12)

CDR1-HC GFDFSNY **(SEQ ID NO: 441)**

CDR2-HC GDSASY **(SEQ ID NO: 442)**

CDR3-HC ASEGSYWYYEAGGIDT **(SEQ ID NO: 443)**

Белок HC **(SEQ ID NO: 444)**
AVTLDESGGGLQTPGGTLSLVCKASGFDFSNYEMLWVRQAPGKGLEYVAGIGDSASY
SAYGVAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNGLRAEDTGTYYCTKASEGSYWYYEAGGIDT
WGHGTEVIVSS

ДНК HC **(SEQ ID NO: 445)**

ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGA
GGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCGACTTCAGCAACTACGAAA
TGCTCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCGCTGGTATTG
GCGACAGTGCTAGTTACTCAGCATACGGGGTGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCA
TCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGAGGCTGCAGCTGAACGGCCTCAGGG
CTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCACCAAAGCTTCCGAGGGTTCCTACTGGTA
TTATGAAGCTGGTGGTATCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC SGGSSTYG **(SEQ ID NO: 446)**

CDR2-LC RNDNRPS **(SEQ ID NO: 447)**

CDR3-LC GSADSSGAI **(SEQ ID NO: 448)**

Белок LC **(SEQ ID NO: 449)**

ALTQPSSVSANLGGTVEITCSGGSSTYGWYQQKSPGSAPVTVIYRNDNRPSNIPSRFS
GSKYGSTGTLTITGVQAEDEAVYLCGSADSSGAIFGAGTTLTVL

ДНК LC **(SEQ ID NO: 450)**
GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGGAACCGTCGAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTAGCAGCACCTATGGCTGGTACCAGCAGAAGTCTCCTGGCA
GTGCCCCTGTCACTGTGATCTATAGGAACGACAACAGACCCTCAAACATCCCTTCA
CGATTCTCCGGTTCCAAATACGGCTCCACGGGCACATTAACCATCACTGGGGTCC
AAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTATGTGGGAGTGCAGACAGCAGTGGTGCTAT
ATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

Ат90 (MCT1 3308 A05)

CDR1-HC GFSFSGF **(SEQ ID NO: 451)**

CDR2-HC DDGGSS **(SEQ ID NO: 452)**

CDR3-HC DTAACTYPCGSYVHTIDT **(SEQ ID NO: 453)**

Белок HC **(SEQ ID NO: 454)**

AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFSFSGFSMGWVRQTPGKGLEWVAGIDDGGS
STYYGAAVKGRATISRDNGQSTVRLQLSNLRAEDTGIYYCARDTAACTYPCGSYVHTI
DTWGHGTEVIVSS

ДНК HC **(SEQ ID NO: 455)**

TCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGC
GCTCAGTCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCTCCTTCAGTGGTTTCAGCATGGGT
TGGGTGCGCCAGACGCCCGGCAAAGGGCTGGAATGGGTCGCTGGTATTGATGAT
GGTGGCAGTAGCACCTACTACGGGGCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCG
AGGGACAACGGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAGCAACCTCAGGGCTGAG
GACACCGGCATCTACTACTGCGCCAGAGATACTGCTGCTTGTACTTATCCTTGTGG
TTCTTATGTGCATACGATAGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCT
CG

CDR1-LC SGGGGDYG **(SEQ ID NO: 456)**

CDR2-LC YSDKRPP **(SEQ ID NO: 457)**

CDR3-LC GGWDDTNGGI **(SEQ ID NO: 458)**

Белок LC **(SEQ ID NO: 459)**

ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGGGDYGWFQQKSPGSAPVTVIYYSDKRPPNIPSRFS
GSLSGSTATLTITGVQAEDEAVYYCGGWDDTNGGIFGAGTTLTVL

ДНК LC **(SEQ ID NO: 460)**
GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGGAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTGGTGGCGACTATGGCTGGTTCCAGCAGAAGTCTCCTGGCA
GTGCCCCTGTCACTGTGATCTATTACAGCGACAAGAGACCCCCGAACATCCCTTCA
CGATTCTCCGGTTCCCTATCCGGCTCCACAGCCACATTAACCATCACTGGGGTCCA
AGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTACTGTGGTGGCTGGGACGATACTAATGGTGGT
ATATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

Ат91 (MCT1 3309 D07)

CDR1-HC GFSFSSY **(SEQ ID NO: 461)**

CDR2-HC RSSGSS **(SEQ ID NO: 462)**

CDR3-HC AGCSDCWRSTPGRIDA **(SEQ ID NO: 463)**

Белок HC **(SEQ ID NO: 464)**
AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFSFSSYGMGWVRQAPGKGLEFIAGIRSSGSS
TYYGAAVKGRATITRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTATYYCAKAGCSDCWRSTPGRIDA
WGHGTEVIVSS

ДНК HC **(SEQ ID NO: 465)**
ACGAATTCGGCCGTGACGTTGGACGAGTCTGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGA
GGAGGGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCTCCTTCAGCAGTTATGGCA
TGGGCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATTCATCGCGGGTATTA
GAAGCAGTGGTAGTAGCACATACTACGGGGCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCA
TCACGAGGGACAACGGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGG
CTGAGGACACCGCCACCTACTACTGCGCCAAAGCTGGTTGTAGTGATTGTTGGCG
TAGTACTCCTGGTAGGATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCC
TCG

CDR1-LC SGSSSGYGYG **(SEQ ID NO: 466)**

CDR2-LC TNTNRPS **(SEQ ID NO: 467)**

CDR3-LC GSYDSNTYLGL **(SEQ ID NO: 468)**

Белок LC **(SEQ ID NO: 469)**
ALTQPSSVSANLGGTVEITCSGSSSGYGYGWYQQKSPGSAPVTLIYTNTNRPSDIPSR
FSGSTSGSTNTLTIAGVQAEDEAVYYCGSYDSNTYLGLFGAGTTLTVL

ДНК LC **(SEQ ID NO: 470)**
GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGGAACCGTCGAGATCA
CCTGCTCCGGGAGTAGCAGTGGCTATGGTTATGGCTGGTATCAGCAGAAGTCACC
TGGCAGTGCCCCTGTCACTCTGATCTATACTAACACCAACAGACCCTCGGACATCC
CTTCGCGATTCTCCGGTTCCACATCCGGCTCCACAAACACATTAACGATCGCTGGG
GTCCAAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTATTGTGGGAGCTACGACAGCAACACTT
ATCTTGGTCTATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

<u>Ат92</u> (MCT1 3310 A05)

CDR1-HC GFTFSSY **(SEQ ID NO: 471)**

CDR2-HC SKDGGSD **(SEQ ID NO: 472)**

CDR3-HC GIGVGNIDA **(SEQ ID NO: 473)**

Белок HC **(SEQ ID NO: 474)**

AVTLDESEGGLHTPGGGLSLVCKASGFTFSSYAMYWIRQAPGKGLEWVAYISKDGGS
DTAYETAVKGRATISRDDGQSTVRLQLNNLRAEDTATYYCARGIGVGNIDAWGHGTEV
IVSS

ДНК HC **(SEQ ID NO: 475)**
GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGAGGGCGGCCTCCATACACCCGGAGGAGGGCTC
AGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCACCTTCAGCAGTTATGCCATGTACTGGA
TCCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCGCCTATATTAGCAAGGATG
GTGGTAGTGACACAGCATACGAGACAGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGA
GGGACGACGGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGG

ACACCGCCACCTACTACTGCGCCAGAGGTATTGGTGTTGGTAACATCGACGCATG
GGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC

CDR1-LC SGSSSGYGYG **(SEQ ID NO: 476)**

CDR2-LC TNTNRPS **(SEQ ID NO: 477)**

CDR3-LC GSYDSNTYLGL **(SEQ ID NO: 478)**

Белок LC **(SEQ ID NO: 479)**

ALTQPSSVSANLGETVKITCSGTSDNNYFGWYQQKSPGSAPVTVIYGNDKRPSDIPSR
FSGSKSGSTATLTITGVQADDEAVYFCGSYDTYVNDDIFGAGTTLTVL

ДНК LC **(SEQ ID NO: 480)**

GCCCTGAcTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGAAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGACTAGTGACAATAACTACTTTGGTTGGTATCAGCAGAAGTCTCCT
GGCAGTGCCCCTGTCACGGTGATCTATGGCAACGACAAGAGACCCTCGGACATCC
CTTCACGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACGGCCACATTAACCATCACTGGG
GTCCAAGCCGACGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGCTATGACACCTATGTTAA
TGATGATATATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTA

<u>Ат93</u> (MCT1 3310 A12)

CDR1-HC GFDFSSY **(SEQ ID NO: 481)**

CDR2-HC YKDGGSD **(SEQ ID NO: 482)**

CDR3-HC GIGIGNIDA **(SEQ ID NO: 483)**

Белок HC **(SEQ ID NO: 484)**
AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFDFSSYAMYWIRQAPGKGLEWVAYIYKDGGS
DTAYETAVKGRATISRDDGQSTMRLQLNNLRAEDTATYYCARGIGIGNIDAWGHGTEVI
VSS

ДНК HC **(SEQ ID NO: 485)**

GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGGGCT
CAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTTGACTTCAGCAGTTACGCCATGTACTGG
ATCCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCGCCTATATTTACAAGGAT
GGTGGTAGTGACACAGCATACGAGACAGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCG
AGGGACGACGGGCAGAGTACGATGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAG
GACACCGCCACCTACTACTGTGCCAGAGGTATTGGTATTGGTAACATCGACGCAT
GGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC

CDR1-LC SGNSDNNYFG **(SEQ ID NO: 486)**

CDR2-LC GNDKRPS **(SEQ ID NO: 487)**

CDR3-LC GSYDTYVNDDM **(SEQ ID NO: 488)**

Белок LC **(SEQ ID NO: 489)**
ALTQPSSVSANPGGTVEITCSGNSDNNYFGWFQQKSPGSAPVTVIYGNDKRPSDIPSR
FSGSKSGSTATLTITGVQADDEAVYFCGSYDTYVNDDMFGAGTTLTVL

ДНК LC **(SEQ ID NO: 490)**

GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCGGGAGGAACCGTCGAGATC
ACCTGCTCCGGGAATAGTGACAATAACTACTTTGGCTGGTTCCAGCAGAAGTCTCC
TGGCAGTGCCCCAGTCACTGTGATCTATGGCAACGACAAGAGACCCTCGGACATC
CCTTCACGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACGGCCACATTAACCATCACTGG
GGTCCAAGCCGACGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGCTACGACACCTATGTC
AATGATGACATGTTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTT

<u>Ат94</u> (MCT1 3311 B04)

CDR1-HC GFTFSSF **(SEQ ID NO: 491)**

CDR2-HC SNDGGG **(SEQ ID NO: 492)**

CDR3-HC GGGASSIDA **(SEQ ID NO: 493)**

Белок HC **(SEQ ID NO: 494)**
AVTLDESEGGLQTPGGTLSLVCKGSGFTFSSFNMFWVRQAPGKGLEFVAAVSNDGG
GTWYATAVKGRATISKDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCARGGGASSIDAWGHGTE
VIVSS

ДНК HC **(SEQ ID NO: 495)**

GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGAGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAACGCT
CAGCCTCGTCTGCAAGGGCTCCGGGTTCACCTTCAGCAGCTTCAACATGTTCTGG
GTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATTCGTCGCTGCTGTTAGCAATGAT
GGTGGTGGCACATGGTACGCGACGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAAG
GACAACGGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGAC
ACCGGCACCTACTACTGCGCCAGAGGTGGTGGTGCCAGTAGTATCGACGCATGG
GGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC

CDR1-LC SGGSGRYG **(SEQ ID NO: 496)**

CDR2-LC ANTKRPS **(SEQ ID NO: 497)**

CDR3-LC GSIDNNYVGI **(SEQ ID NO: 498)**

Белок LC **(SEQ ID NO: 499)**
ALTQPSSVSANPGETVKITCSGGSGRYGWYQQKSPGSAPVTVIRANTKRPSDIPSRFS
GSKSGSTGTLTITGVQVEDEAVYFCGSIDNNYVGIFGAGTTLTVL

ДНК LC **(SEQ ID NO: 500)**
GCCCTGAcTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCAGGAGAAACCGTCAAGATCA
CCTGCTCCGGGGGTAGTGGCAGGTACGGCTGGTATCAGCAGAAGTCACCTGGCA
GTGCCCCTGTCACTGTGATCAGGGCTAACACCAAGAGACCCTCGGACATCCCTTC
ACGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACGGGCACATTAACCATCACTGGGGTC
CAAGTCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGCATAGACAACAACTATGTTG
GTATATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTA

Ат95 (MCT1 3311 B07)

CDR1-HC GFTISSY **(SEQ ID NO: 501)**

CDR2-HC SGSGRY **(SEQ ID NO: 502)**

CDR3-HC DGGGNYWNAAGGIDA **(SEQ ID NO: 503)**

Белок HC **(SEQ ID NO: 504)**

AVTLDESGGGLQTPGGTLSLVCKGSGFTISSYTMQWVRQAPDKGLEYVASISGSGRY
TGYGAAVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCAKDGGGNYWNAAGGIDA
WGHGTEVIVSS

ДНК HC **(SEQ ID NO: 505)**

GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAACGCT
CAGCCTCGTCTGCAAGGGCTCCGGGTTCACCATCAGCAGTTACACCATGCAGTGG
GTGCGACAGGCGCCCGACAAGGGGTTGGAATATGTCGCCAGTATTAGCGGCAGT
GGTAGATACACAGGCTACGGGGCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGG
GACAACGGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGAC
ACCGGCACCTACTACTGCGCCAAAGATGGTGGTGGTAATTACTGGAATGCTGCTG
GTGGTATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC

CDR1-LC SGGSSTYG **(SEQ ID NO: 506)**

CDR2-LC NDDERPS **(SEQ ID NO: 507)**

CDR3-LC GNEDSSAGKGGI **(SEQ ID NO: 508)**

Белок LC **(SEQ ID NO: 509)**

ALTQPSSVSANLGGTVEITCSGGSSTYGWYQQKSPGSAPVTLIYNDDERPSNIPSRFS
GSTSDFTGTLTITGVQADDEAVYFCGNEDSSAGKGGIFGAGTTLTVL

ДНК LC **(SEQ ID NO: 510)**

GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCGAACCTGGGAGGAACCGTCGAGATC
ACCTGCTCCGGGGGTAGCAGCACCTATGGCTGGTACCAGCAGAAGTCTCCTGGCA
GTGCCCCTGTCACTCTGATTTATAATGATGATGAGAGACCCTCGAACATCCCTTCA
CGATTCTCCGGTTCCACATCCGACTTCACGGGCACATTAACCATCACTGGGGTCCA
AGCCGACGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAATGAAGACAGCAGTGCTGGTAAA
GGTGGCATATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTA

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с одним или несколькими остатками, содержащимися во внеклеточном домене или области МСТ1 человека или не человека.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с МСТ1 человека или не человека, который антагонизирует, ингибирует или блокирует одну или несколько функций, связанных с МСТ1, например, *in vitro* и/или *in vivo*.

3. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с МСТ1 не человека, например, грызуна, таким как МСТ1 мыши или крысы, который необязательно антагонизирует, ингибирует или блокирует одну или несколько функций, связанных с МСТ1, например, *in vitro* и/или *in vivo*.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, который дополнительно связывается с МСТ1 человека.

5. Выделенное анти-МСТ1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует за связывание с МСТ1 человека или не человека, как любое из антител против МСТ1 человека Ат1-Ат95.

6. Выделенное анти-МСТ1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тем же самым или перекрывающимся эпитопом на МСТ1 человека, как любое из антител против МСТ1 человека Ат1-Ат95.

7. Выделенное анти-МСТ1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с эпитопом на МСТ1 человека, выбранного из следующего:

   (i) эпитопа, который содержит один или несколько остатков T41, E46, S285, S286, Y287, K289, H292, Y293, K297, G417, I47 и D418;

   (ii) эпитопа, который содержит, по меньшей мере, три остатка, в котором, по меньшей мере, один, два или все три из указанных остатков содержат остаток, выбранный из T41, E46, S285, S286, Y287, K289, H292, Y293, G417, I47 и D418;

(iii) эпитопа, который содержит три остатка, в котором, по меньшей мере, один, два или все три из указанных остатков содержат T41, E46, S285, S286, Y287, K289, H292, Y293, G417, I47 и D418;

(iv) эпитопа, который содержит от трех до шести остатков, в котором, по меньшей мере, один, два, три, четыре, пять или все шесть из указанных остатков содержат T41, E46, S285, S286, Y287, K289, H292, Y293, G417, I47 и D418;

(v) эпитопа, который содержит, по меньшей мере, один, два или все три остатка T41, S285 и S286;

(vi) эпитопа, который содержит T41;

(vii) эпитопа, который содержит S286;

(viii) эпитопа, который содержит S285;

(ix) эпитопа, который содержит H292;

(x) эпитопа, который содержит остатки T41, S285, S286, Y287, G417, и D418;

(xi) эпитопа, который содержит остатки T41, S285 и S286;

(xii) эпитопа, который содержит остатки T41, I47, S285, S286, G417 и D418;

(xiii) эпитопа, который содержит остатки E46, K289 и H292;

(xiv) эпитопа, который содержит остатки K297, Y293 и H292;

(xv) эпитопа, который содержит один или несколько соответствующих остатков не относящегося к человеку MCT1, например, выбранного из принадлежащего грызуну (например, мыши, крысе, морской свинке), кролику, цыпленку, не относящегося к человеку примату (например, яванскому макаку, шимпанзе, орангутану), корове, овце, собаке и кошке;

при этом необязательно остатки, присутствующие в указанном эпитопе, идентифицируют с использованием сканирования аланином.

8. Выделенное анти-MCT1 антитело или их антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с эпитопом на MCT1 человека, выбранном в соответствии с п. 7, при этом указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно взаимодействует с одним или несколькими из следующих остатков:

(i) один или несколько из остатков P37, I40, K45, E48 и T55 (петля 1);

(ii) остаток Q111 (петля 2);

(iii) остаток Q166 (петля 3);

(iv) один или несколько из остатков L284, E296, S298 (петля 4);

(v) остаток Y353 (петля 5);

(vi) один или несколько из остатков Y419, T422 (петля 6); и/или

(vii) любая комбинация вышеизложенного.

9. Выделенное анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связываются с эпитопом на на MCT1 не человека, при этом MCT1 не человека необязательно выбирают из принадлежащего грызуну (например, мыши, крысе, морской свинке), кролику, птице (например, цыпленку, индейке, гусю), не человекообразному примату (например, яванской макаке, шимпанзе, орангутану), корове, овце, собаке, кошке, при этом необязательно указанный эпитоп на MCT1 не человека содержит один или несколько соответствующих остатков в MCT1 не человека, как один или несколько из T41, S285, S286, Y287, G417, I47 и D418 MCT1 человека.

10. Выделенное анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8 или п. 9, которое антагонизирует, ингибирует или блокирует одну или несколько активностей указанного не относящегося к человеку MCT1, например *in vitro* и/или *in vivo*.

11. Выделенное анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, который является человеческим, гуманизированным, принадлежащим не человекообразному примату, приматизированным, принадлежащим цыпленку, грызуну или химерным.

12. Выделенное анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, который ингибирует MCT1 человека-опосредованный транспорт лактата, например, *in vitro* и/или *in vivo*.

13. Выделенное анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, который связывается с эндогенными экспрессирующими MCT1 клетками и/или связывается с рекомбинантными или сконструированными экспрессирующими MCT1 клетками, например, экспрессирующими MCT1 клетками человека 293.

14. Выделенное анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбирают из группы, состоящей из человеческого или гуманизированного моноклонального антитела; моноспецифического антитела; полиспецифического антитела; мультиспецифического антителоподобного полипептида, гуманизированного антитела; человеческого или гуманизированного тетрамерного антитела; человеческого или гуманизированного четырехвалентного антитела; человеческого или гуманизированного мультиспецифического антитела; одноцепочечного антитела; домен-специфического антитела; однодоменного антитела; антитела с удаленным доменом; слитого белка scFc; химерного антитела; синтетического антитела; рекомбинантного антитела; гибридного антитела; мультиспецифического антитела, биспецифического антитела, ByTE, мутированного антитела; CDR-привитых антител; фрагмента антитела; Fab; F(ab')2; Fab'-фрагмента; Fv-фрагмента; одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv); Fd-фрагмента; фрагмента dAb; диател; нанотел; бивалентного нанотела; антитела VHH; и минитела.

15. Выделенное анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, который представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

16. Выделенное анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, который содержит, по

меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 CDR любого из анти-MCT1 антител Ат1-Ат95, при этом необязательно указанные CDR определены по Кабату или по Чотиа и Леску, или выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует за связывание с MCT1 или который связывает тот же самый эпитоп с любым из анти-MCT1 антител Ат1-Ат95, или аффинно-зрелый вариант любого из вышеизложенного.

17. Гуманизированное анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, который содержит те же самые CDR из любого из анти-MCT1 антител Ат1-Ат95, при этом необязательно указанные CDR определены по Кабату или по Чотиа и Леску.

18. Анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, который содержит тот же самый полипептид V_H, который содержится в анти-MCT1 антителе, выбранном из Ат1-Ат95 или их гуманизированных вариантов.

19. Анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, который содержит тот же самый полипептид V_L, который содержится в анти-MCT1 антителе, выбранном из Ат1-Ат95 или их гуманизированных вариантов.

20. Анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, который содержит полипептид V_H и полипептид V_L, которые являются идентичными полипептидам, содержащимся в анти-MCT1 антителе, выбранном из Ат1-Ат95 или их гуманизированных вариантов.

21. Анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, который содержит полипептид вариабельного домена тяжелой цепи и/или полипептид вариабельного домена легкой цепи соответственно, имеющие, по меньшей мере, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с полипептидом вариабельного домена тяжелой цепи и/или полипептидом вариабельного домена легкой цепи, содержащимся в любом из анти-MCT1 антител Ат1-Ат95.

22. Выделенное анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, который содержит полипептиды CDR1, 2 и 3 V_H соответственно, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4-6, и полипептиды CDR1, 2 и 3 VL соответственно, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7-9.

23. Гуманизированное анти-MCT1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, происходящий из любого из Ат1-Ат95, необязательно содержащий такие же CDR, как любое из Ат1-Ат95, при этом необязательно указанные CDR определены по Кабату или по Чотиа и Леску.

24. Аффинно-зрелое анти-MCT1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, происходящий из любого из Ат1-Ат95, при этом не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 остатков CDR мутированы относительно остатков CDR, которые содержатся в 6 полипептидах CDR любого из Ат1-Ат95, при этом необязательно указанное аффинно-зрелое анти-MCT1 антитело связывается с MCT1 человека, по меньшей мере, с такой же самой или более высокой аффинностью, что и анти-MCT1 антитело, из которого оно происходит, и/или аффинно-зрелое антитело или антигенсвязывающий фрагмент антагонизирует MCT1 человека, например, in vitro и/или in vivo, при этом необязательно указанные CDR определены по Кабату или по Чотиа и Леску.

25. Аффинно-зрелое анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий фрагмент по п. 24, отличающийся тем, что не более 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 остатков CDR мутированы относительно полипептидов CDR любого из Ат1-Ат95.

26. Аффинно-зрелое анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий фрагмент по п. 24, отличающийся тем, что не более 1, 2, 3 или 4 остатков CDR мутированы относительно полипептидов CDR любого из Ат1-Ат95.

27. Аффинно-зрелое анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий фрагмент по п. 24, отличающийся тем, что не более 1 или 2 остатков CDR мутированы относительно полипептидов CDR любого из Ат1-Ат95.

28. Антитело против MCT1 человека или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, который дополнительно связывается с не относящимся к человеку MCT1, необязательно MCT1 грызуна, кролика, цыпленка или не человекообразного примата.

29. Анти-MCT1 антитело, содержащее полипептиды VH и VL SEQ ID NO: 2 и 3; SEQ ID NO: 12 и 13; SEQ ID NO: 14 и 15; SEQ ID NO: 16 и 17; или антитело, содержащее полипептиды VL и/или VH любого из антител Ат5-Ат95, или содержащее гуманизированные или аффинно-зрелые варианты полипептидов VL и/или VH любого из антител Ат5-Ат95.

30. Анти-MCT1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий полипептид вариабельного домена тяжелой цепи или полипептид тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 12, 14, 16, 19-32, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153 и 155; и полипептид вариабельного домена легкой цепи или полипептид легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 3, 13, 15, 17, 33-44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154 и 156.

31. Анти-MCT1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий полипептид вариабельного домена тяжелой цепи и полипептид вариабельного домена легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, соответственно выбранную из следующего: SEQ ID NO: 2 и 3; SEQ ID NO: 12 и 13; SEQ ID NO: 14 и 15; SEQ ID NO: 16 и 17; SEQ ID NO: 45 и 46; SEQ ID NO: 47 и 48; SEQ ID NO: 49 и 50; SEQ ID NO: 51 и 52; SEQ ID NO: 53 и 54; SEQ ID NO: 55 и 56; SEQ ID NO: 57 и 58; SEQ ID NO: 59 и 60; SEQ ID NO: 61 и 62; SEQ ID NO: 63 и 64; SEQ ID NO: 65 и 66; SEQ ID NO: 67 и 68; SEQ ID NO: 69 и 70; SEQ ID NO: 71 и 72; SEQ ID NO: 73 и 74; SEQ ID NO: 75 и 76; SEQ ID NO: 77 и 78; SEQ ID NO: 79 и 80; SEQ ID NO: 81 и 82; SEQ ID NO: 83 и 84; SEQ ID NO: 85 и 86; SEQ ID NO: 87 и 88; SEQ ID NO: 89 и 90; SEQ ID NO: 91 и 92; SEQ ID NO:

93 и 94; SEQ ID NO: 95 и 96; SEQ ID NO: 97 и 98; SEQ ID NO: 99 и 100; SEQ ID NO: 101 и 102; SEQ ID NO: 103 и 104; SEQ ID NO: 105 и 106; SEQ ID NO: 107 и 108; SEQ ID NO: 109 и 110; SEQ ID NO: 111 и 112; SEQ ID NO: 113 и 114; SEQ ID NO: 115 и 116; SEQ ID NO: 117 и 118; SEQ ID NO: 119 и 120; SEQ ID NO: 121 и 122; SEQ ID NO: 123 и 124; SEQ ID NO: 125 и 126; SEQ ID NO: 127 и 128; SEQ ID NO: 129 и 130; SEQ ID NO: 131 и 132; SEQ ID NO: 133 и 134; SEQ ID NO: 135 и 136; SEQ ID NO: 137 и 138; SEQ ID NO: 139 и 140; SEQ ID NO: 141 и 142; SEQ ID NO: 143 и 144; SEQ ID NO: 145 и 146; SEQ ID NO: 147 и 148; SEQ ID NO: 149 и 150; SEQ ID NO: 151 и 152; SEQ ID NO: 153 и 154 и SEQ ID NO: 155 и 156.

32. Гуманизированное анти-MCT1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, которые содержат полипептид V_L, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 3, 13, 15, 17 и 33-44 или аминокислотной последовательности любого из антител Ат5-Ат60.

33. Гуманизированное анти-MCT1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, которые содержат полипептид V_H, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2, 12, 14, 16 и 19-32 или аминокислотной последовательности любого из антител Ат5-Ат60.

34. Гуманизированное анти-MCT1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из предыдущих пунктов, который содержит полипептид V_L, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 13, 15, 17 и 33-44, и полипептид V_H, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 12, 14, 16 и 19-32 или аминокислотной последовательности любого из антител Ат5-Ат60.

35. Гуманизированное анти-MCT1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, которые содержат полипептид V_L, имеющий последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности

последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 3, 13, 15, 17, 33-44, или по отношению к полипептиду V_L, содержащемуся в любом из антител Ат5-Ат95.

36. Гуманизированное анти-MCT1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, которые содержат полипептид V_H, имеющий последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или 100% идентичность последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 2, 12, 14, 16, 19-32, или по отношению к полипептиду V_H, содержащемуся в любом из антител Ат5-Ат95.

37. Гуманизированное анти-MCT1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, которые содержат полипептид V_L, имеющий последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 3, 13, 15, 17, 33-44 или по отношению к полипептиду V_L, содержащемуся в любом из антител Ат5-Ат95, и/или полипептид V_H, имеющий последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или 100% идентичность последовательности по отношению к полипептиду V_H SEQ ID NO: 2, 12, 14, 16, 19-32 или по отношению к полипептиду VH, содержащемуся в любом из антител Ат5-Ат95.

38. Гуманизированное анти-MCT1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что последовательность CDR3 тяжелой цепи содержит 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 аминокислотных остатка.

39. Гуманизированное анти-MCT1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что последовательность CDR3 тяжелой цепи содержит 21, 22, 23 или 24 аминокислотных остатка.

40. Выделенное анти-MCT1 человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что последовательность CDR3 тяжелой цепи является идентичной SEQ ID NO: 6 или отличается от нее не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток, необязательно при этом указанные различия,

если они присутствуют, включают в себя консервативные аминокислотные замены или содержат замещающие аминокислоты, которые преобладают в том же самом положении в CDR3 тяжелой цепи антител человека или грызунов, содержащих CDR3 той же самой длины.

41. Выделенное анти-MCT1 человеческое или гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, который конкурирует за связывание с MCT1 с референтным антителом, при этом референтное антитело выбирают из Ат1-Ат95.

42. Антитело против MCT1 человека или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие те же самые полипептиды CDR любого из Ат1-Ат95 и/или содержащие те же самые полипептиды вариабельного домена тяжелой цепи и/или вариабельного домена легкой цепи, что и антитело против MCT1 человека, выбранное из Ат1-Ат95.

43. Анти-MCT1 антитело, содержащее полипептиды вариабельного домена тяжелой цепи и/или вариабельного домена легкой цепи антитела, выбранного из Ат1-Ат95.

44. Анти-MCT1 человеческое или гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, которые содержат константные области тяжелой и/или легкой цепи, необязательно константные области тяжелой и/или легкой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, константная (константные) область (области) которых необязательно мутирована(ны) для ослабления или усиления, по меньшей мере, одной эффекторной функции.

45. Анти-MCT1 антитело по п. 44, отличающееся тем, что указанные эффекторные функции включают в себя связывание FcR, связывание комплемента, функцию ADCC, связывание FcRN и гликозилирование.

46. Анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента образуют трехмерную структуру антитела, аналогичную или такую же самую, что и CDR Ат1, как указано положениями альфа-углеродов в соответствующих CDR, отличающимися средним среднеквадратичным отклонением (RMSD),

составляющим менее чем 2,0 Å, менее чем 1,0 Å или менее чем 0,5 Å, как определятся с помощью структурного выравнивания.

47. Гуманизированное антитело или их антигенсвязывающий фрагмент, содержащий последовательности CDR вариабельного домена тяжелой цепи Ат1 (SEQ ID NOS: 4, 5, 6) и последовательности CDR вариабельного домена легкой цепи Ат1 (SEQ ID NO: 7, 8, 9).

48. Анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие домен V_H, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена V_H Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 2); и содержащие домен V_L, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена V_L Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 3).

49. Анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, который содержит константные домены человека, необязательно IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, дополнительно необязательно модифицированные для усиления, по меньшей мере, одной эффекторной функции Fc, выбранной из гликозилирования, связывания FcR, связывания FcRN, связывания комплемента и функции ADCC.

50. Анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, который содержит константные области IgG1 человека, необязательно модифицированные для уменьшения связывания FcR и/или связывания комплемента, дополнительно необязательно включающие мутации E269R и/или K322A, и/или указанные константные области IgG1 человека содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

51. Слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифических или биспецифических антител, содержащий, по

меньшей мере, одно анти-MCT1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов.

52. Анти-MCT1 антитело или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифического или биспецифического антитела по любому из предыдущих пунктов, который снижает активность Т-эффекторных клеток и/или количество Т-эффекторных клеток, например, $CD3^+$, $CD4^+$ или $CD8^+$ Т-эффекторных клеток.

53. Анти-MCT1 антитело, слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифических или биспецифических антител по любому из предыдущих пунктов, который повышает активность и/или количество Tr1-клеток.

54. Анти-MCT1 антитело или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифического или биспецифического антитела по любому из предыдущих пунктов, который снижает активность Т-эффекторных клеток и/или количество Т-эффекторных клеток, например, $CD3^+$, $CD4^+$ или $CD8^+$ Т-эффекторных клеток, и который дополнительно повышает активность и/или число Tr1 клеток.

55. Клетка, которая экспрессирует, по меньшей мере, одно анти-MCT1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифических или биспецифических антител по любому из предыдущих пунктов.

56. Клетка по п. 55, которая представляет собой клетку человека, не относящегося к человеку млекопитающего, дрожжевых грибов, бактерий, амфибий, растений, насекомых или рептилий.

57. Клетка по п. 55, которая представляет собой клетку человека, необязательно иммунную клетку человека, например, Т-клетку, NK-клетку, моноцит, регуляторную Т клетку или макрофаг.

58. Антиидиотипическое антитело, продуцируемое против анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из предшествующих пунктов формулы изобретения, необязательно, которое является человеческим, гуманизированным и/или аффинно-зрелым.

59. Анти-антиидиотипическое антитело, продуцируемое против антиидиотипического антитела по п. 58, которое связывает MCT1.

60. Анти-антиидиотипическое антитело по п. 59, которое блокирует или антагонизирует одну или несколько активностей MCT1.

61. Слитый белок, который содержит анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, или полипептид CDR3 VH SEQ ID NO: 6, или вариант, обладающий по меньшей мере 80% ной идентичностью последовательности по отношению к нему, который прямо или косвенно связан с другим полипептидом, например, полипептидом антитела или доменом антитела, сывороточным альбумином, человеческим сывороточным альбумином или сывороточным альбумином другого примата, аднектином, аффителом, DARPin, антикалином, гликолем (PEG), монометокси-ПЭГ (мПЭГ), молекулой XTEN, молекулой рПЭГ или фрагментом или вариантом любого из вышеизложенного.

62. Слитый белок по п. 61, отличающийся тем, что полипептид или домен антитела содержит Fc-полипептид или его фрагмент, например, Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека или его фрагмент.

63. Анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифического или биспецифического антитела по любому из предыдущих пунктов или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного по любому из предыдущих пунктов, которая вызывает одно или несколько из следующих свойств при связывании с MCT1 на поверхности клетки, например, активированной Т-клетки или В-клетки, дополнительно необязательно на поверхности клетки человека:

(i) ингибирует транспорт лактата;

(ii) ингибирует транспорт бромпирувата;

(iii) ингибирует транспорт одного или нескольких монокарбоксилатов, пирувата, оксокислот с разветвленной цепью, происходящих из лейцина, валина и изолейцина, кетоновых тел, ацетоацетата, бета-гидроксибутирата, ацетата, молочной кислоты, клеточных питательных веществ, метаболитов, ионов, гормонов, липидов, и кетонов;

(iv) ингибирует пролиферацию CD3/CD28-стимулированных Т-клеток;

(v) ингибирует пролиферацию активированной Т-клетки или В-клетки;

(vi) ингибирует продуцирование одного или нескольких воспалительных цитокинов;

(vii) уменьшает активность и/или количество эффекторных Т-клеток, например $CD3^+$, $CD4^+$ и/или $CD8^+$ эффекторных Т-клеток;

(viii) повышает долю или активность регуляторных Т (Treg) клеток;

(ix) ингибирует аллогенную активацию в реакции смешанных лимфоцитов;

(x) или комбинацию любого из вышеизложенного.

64. Анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифических или биспецифических антител по любому из предыдущих пунктов, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного, например, по любому из предыдущих пунктов, которое ингибирует продуцирование одного или нескольких воспалительных цитокинов при связывании с MCT1.

65. Анти-MCT1 антитело или их антигенсвязывающий фрагмент или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифических или биспецифических антител по любому из предыдущих пунктов, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного по п. 64, при этом, по меньшей мере, один или несколько воспалительных цитокинов выбирают из FGF2, FLT-3L,

фракталкина, G-CSF, GM-CSF, GRO, ИФНα2, ИФНγ, ИЛ-3, ИЛ-5, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-12p40, ИЛ-12p70, ИЛ-13, ИЛ-17a, IP-10, MCP-1, MDC, MIP-1a, MIP-1b, sCD40L, ФНОα и ФНОβ.

66. Анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифических или биспецифических антител по любому из предыдущих пунктов, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного по п. 64 или п. 65, при этом, по меньшей мере, один или несколько воспалительных цитокинов выбирают из ИФНγ, GM-CSF, ФНОα, ИЛ-10 и ИЛ-6.

67. Анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифических или биспецифических антител по любому из предыдущих пунктов, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного, которое ингибирует MCT1-опосредованный транспорт лактата в активированные Т-клетки со значением Kd, составляющим менее чем 100 нМ, менее чем 50 нМ или менее чем 10 нМ, как определяют с помощью анализа лактата FLIPR.

68. Анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифических или биспецифических антител по любому из предыдущих пунктов, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного, которое не:

(i) связывается с MCT2, MCT3, MCT4 и/или CD147, как измеряют с помощью проточной цитометрии;

(ii) ингибирует транспорт MCT2, MCT3 и/или MCT4;

(iii) ингибирует продуцирование ИЛ-2;

(iv) ингибирует транспорт лактата в моноцитах;

(v) ингибирует пролиферацию наивных, покоящихся и/или регуляторных Т-клеток;

(vi) ингибирует транспорт лактата в эритроцитах;

(vii) изменяет экспрессию одного или нескольких маркеров Т-клеточной активации, необязательно выбранных из CD25, CD54, CD69, CD95, CD98, CD147, CD154, CD278, CD279 и HLA-DR/DP/DQ.

69. Анти-MCT1 антитело или их антигенсвязывающий фрагмент или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифических или биспецифических антител по любому из предыдущих пунктов, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного, которое содержит Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, необязательно Fc-область, которая была модифицирована для изменения, по меньшей мере, одного из эффекторной функции, периода полужизни, протеолиза или гликозилирования, при этом необязательно Fc-область содержит одну или несколько мутаций, которые изменяют или устраняют N- и/или O-гликозилирование.

70. Анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифических или биспецифических антител по любому из предыдущих пунктов, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного, которое связывается с MCT1 человека с аффинностью (KD), составляющей менее чем 100 нМ, менее чем 50 нМ или менее чем 10 нМ.

71. Анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифических или биспецифических антител по любому из предыдущих пунктов, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного, которое дополнительно имеет одну или несколько из следующих модификаций:

(i) конъюгировано с цитотоксическим агентом;

(ii) содержится в биспецифическом антителе;

(iii) содержится в мультиспецифическом антигенсвязывающем белке;

(iv) конъюгировано с меткой; а также

(v) конъюгировано с другим терапевтическим агентом, необязательно иммунодепрессивным агентом или химиотерапевтическим агентом.

72. Анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифических или биспецифических антител по любому из предыдущих пунктов, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного, при этом метка представляет собой хемилюминесцентную метку, парамагнитную метку, контрастный агент для получения изображения с помощью МРТ, флуоресцентную метку, биолюминесцентную метку или радиоактивную метку, или цитотоксический агент представляет собой фрагмент, который ингибирует синтез ДНК, РНК или белка; радионуклид; или белок, ингибирующий рибосомы.

73. Анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифических или биспецифических антител по любому из предыдущих пунктов, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного, которое является подходящим для лечения субъекта-человека с аутоиммунным, воспалительным или аллергическим патологическим состоянием; нарушением обмена веществ (например, сахарным диабетом), поликистозным заболеванием почек (ADPKD), раком; реципиента трансплантата, или с EIHI или любым другим патологическим состоянием, при котором сниженное количество и/или активность Т-эффекторных клеток, например, $CD3^+$ Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток и/или $CD8^+$ Т-клеток и/или повышенная активность и/или количество Tr1 или Т-супрессорных клеток является терапевтически предпочтительной.

74. Антиидиотипическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, продуцируемый против анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, по любому из предыдущих пунктов, которые необязательно нейтрализуют один или несколько биологических эффектов анти-MCT1 антитела или антиген-связывающего фрагмента, с которым оно связывается.

75. Анти-антиидиотипическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, продуцируемый против антиидиотипического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, по п. 74, необязательно при этом анти-антиидиотипическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент нейтрализуют антиидиотипическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, с которым оно связывается.

76. Способ применения антиидиотипического антитела по п. 74 для контроля *in vivo* уровней указанного анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента у субъекта или для нейтрализации эффектов *in vivo* указанного анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающий фрагмент у субъекта.

77. Полинуклеотид, кодирующий анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид, или полипептид мультиспецифического или биспецифического антитела, или анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или анти-анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов.

78. Экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид по п. 77.

79. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 77 или экспрессионный вектор по п. 78, необязательно иммунная клетка человека, например Т-клетка, В-клетка или NK-клетка.

80. Фармацевтическая или диагностическая композиция, содержащая эффективное количество анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитого полипептида, химерного антигенного рецептора (CAR), мультиспецифического

антигенсвязывающего полипептида, или полипептида мультиспецифического или биспецифического антитела, или анти-анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или анти-анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из предыдущих пунктов, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного.

81. Фармацевтическая композиция по п. 80, которая является подходящей для использования в лечении или профилактике у человека или не относящегося к человеку организма.

82. Способ получения выделенного анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающие культивирование клетки-хозяина по п. 79 в условиях, которые позволяют экспрессию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из культуральной среды или клетки-хозяина.

83. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически эффективное количество выделенного анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, антиидиотипического антитела, слитого полипептида, химерного антигенного рецептора (CAR), мультиспецифического антигенсвязывающего полипептида, или полипептида мультиспецифического или биспецифического антитела, или клетка, которая экспрессирует любое из вышеизложенного по любому из предыдущих пунктов.

84. Фармацевтическая композиция по п. 83, дополнительно содержащая фармацевтический разбавитель, носитель или наполнитель.

85. Фармацевтическая композиция по п. 83 или п. 84, которая содержит другой терапевтический агент.

86. Фармацевтическая композиция по п. 85, отличающаяся тем, что указанный другой терапевтический агент представляет собой ингибитор митохондрий и/или бигуанид и/или другой транспортер монокарбоксилата (ингибитор MCT), например, ингибитор SLC16A1, SLC16A2, SLC16A3, SLC16A4, SLC16A5, SLC16A6, SLC16A7, SLC16A8, SLC16A9, SLC16A10, SLC16A11, SLC16A12, SLC16A13 или SLC16A14,

или ингибитор MCT1, MCT2, MCT3, MCT4, MCT5, MCT6, MCT7, MCT8, MCT9 или MCT10, при этом указанный ингибитор может ингибировать один или несколько из перечисленных выше транспортеров, и дополнительно указанный ингибитор необязательно содержит малую молекулу, РНКи, антитело, фрагмент антитела или слитый белок.

87. Фармацевтическая композиция по п. 85 или п. 86, отличающаяся тем, что указанный другой активный агент выбирают из иммунодепрессивного препарата, химиотерапевтического агента, бигуанида, например, метформина или другого антидиабетического агента, или противовоспалительного агента, или указанный другой терапевтический агент представляет собой ингибитор митохондрий и/или бигуанид, или указанный другой терапевтический агент выбирают из метформина, фенформина, алексидина, бисбигуанида, буформина, хлоргексидина, хлорпрогуанила, фенилбигуанида, полиаминопропилбигуанида, полигексанида, мороксидина, глипизида, глибурида, репаглинида, саксаглиптина, ситаглиптина, пирвиниума памоата, прогуанила, доксициклина, атовакуона, канаглифлозина, глитазонов (например, троглитазона, пиоглитазона, розиглитазона), тайгециклина, тиазолидов (например, нитазоксанида), салициланилидов (например, клозантела, оксиклозанида, никлозамида), пергексилина, пропонолола, фенофибрата, миконазола, нефазодона, пентамидина, гидрокортизона, метайодбензилгуанидина, лонидамина, альфа-токоферилсукцината (первичная форма витамина Е), угольной ангидразы, ME344 (MEI Pharma), ингибиторов HIF1a (например, хризина, хетомина, диметил-бисфенола А, BAY84-2243), SR13800, диметилоксалоилглицина (DMOG), карбонилцианида п-трифторметоксифенилгидразона (FCCP), карбонилцианид м-хлорфенилгидразона (CCCP), антимицина А, олигомицина, салиномицина, динитрофенола, ротенона, фенформина, тирфостина 9, атпенина А5, берберина, азида, цианида, закиси азота, триоксида мышьяка, пирвиния, канаглифлозина, росиглитазона, амобарбитала, хонокиола, арктигенина, сложного фенилового эфира кофеиновой кислоты, перфеназина, трифлуоперазина, метилглиоксаля и комбинаций, содержащих любое из вышеизложенного.

88. Способ ингибирования активности и/или количества Т-эффекторных клеток, например, CD3+, CD4+ и/или CD8+ Т-эффекторных клеток, у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитого полипептида, химерного антигенного рецептора (CAR), мультиспецифического антигенсвязывающего полипептида или полипептида мультиспецифического или биспецифического антитела по любому из предыдущих пунктов, или клетки, которая экспрессирует, по меньшей мере, одно из вышеизложенного, или фармацевтической композиции, содержащей терапевтически или профилактически эффективное количество любого из вышеизложенного.

89. Способ повышения активности и/или количества Tr1 клеток у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитого полипептида, химерного антигенного рецептора (CAR), мультиспецифического антигенсвязывающего полипептида или полипептида мультиспецифического или биспецифического антитела по любому из предыдущих пунктов, или клетки, которая экспрессирует, по меньшей мере, одно из вышеизложенного, или фармацевтической композиции, содержащей терапевтически или профилактически эффективное количество любого из вышеизложенного.

90. Способ ингибирования активности и/или количества Т-эффекторных клеток, например, $CD3^+$, $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-эффекторных клеток и повышения активности и/или количества Т-супрессоров или Tr1 клеток, у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитого полипептида, химерного антигенного рецептора (CAR), мультиспецифического антигенсвязывающего полипептида или полипептида мультиспецифического или биспецифического антитела по любому из предыдущих пунктов, или клетка, которая экспрессирует, по меньшей мере, одно из вышеизложенного, или фармацевтическая

композиция, содержащая терапевтически или профилактически эффективное количество любого из вышеизложенного.

91. Способ по пп. 88-90, отличающийся тем, что субъект имеет аутоиммунное патологическое состояние, аллергическое патологическое состояние, воспалительное патологическое состояние, нарушение обмена веществ, рак, является реципиентом трансплантата, реципиентом клеточной терапии, имеет состояние EIHI, поликистозное заболевание почек (ADPKD), характеризующийся повышенной активностью Т-эффекторных клеток, например, $CD3^+$, $CD4^+$ или $CD8^+$ и/или сниженной активностью Т-супрессоров или Tr1 клеток и/или сниженным количеством Т-супрессоров или Tr1 клеток.

92. Способ предупреждения или лечения аутоиммунного патологического состояния, аллергического патологического состояния, воспалительного патологического состояния, нарушения обмена веществ, рака, реципиента трансплантата, реципиента клеточной терапии, состояния EIHI, поликистозного заболевания почек (ADPKD), или симптомов, ассоциированных с любым из указанных патологических состояний, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически или профилактически эффективного количества анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитого полипептида, химерного антигенного рецептора (CAR), мультиспецифического антигенсвязывающего полипептида или полипептида мультиспецифического или биспецифического антитела по любому из предыдущих пунктов, или клетка, которая экспрессирует, по меньшей мере, одно из вышеизложенного, или фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически или профилактически эффективное количество любого из вышеизложенного.

93. Способ по п. 92, отличающийся тем, аутоиммунное патологическое состояние, аллергическое патологическое состояние, воспалительное патологическое состояние, нарушение обмена веществ, рак, реципиент трансплантата, реципиент клеточной терапии, состояние EIHI, поликистозное заболевание почек (ADPKD) характеризуются повышенной активностью Т-эффекторных клеток, например, $CD3^+$, $CD4^+$

или $CD8^+$ и/или сниженной активностью Т-супрессоров или Tr1 клеток и/или сниженным количеством Т-супрессоров или Tr1 клеток.

94. Способ по п. 92, п. 93 или п. 94, отличающийся тем, что нарушение обмена веществ включает в себя болезнь Данона, сахарный диабет, галактоземию Дуарте, MDP-синдром, метаболическую миопатию, недостаточность метилентетрагидрофолатредуктазы, синдром Винчестера, чувствительность к салицилату, Х-сцепленную гипофосфатемию, алкогольный кетоацидоз, врожденную непереносимость алкоголя, альфа-аминоадипическую и альфа-кетоадипическую ацидурию, метаболический ацидоз с высоким анионным интервалом, подагру, синдром возобновления кормления, гипонатриемию, ассоциированную с физической нагрузкой, панкреатит, панкреатит и Metab-L.

95. Способ по пп. 88-94, отличающийся тем, что патологическое состояние опосредовано, по меньшей мере, частично активированными Т-клетками или В-клетками и/или клетками, экспрессирующими МСТ1.

96. Способ по любому из пп. 88-95, при этом введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитого белка имеет один или несколько из следующих эффектов:

(i) ингибирует транспорт лактата в активированных Т-клетках или В-клетках;

(ii) ингибирует транспорт токсина бромпирувата в активированных Т-клетках или В-клетках;

(iii) ингибирует пролиферацию CD3/CD28-стимулированных Т-клеток;

(iv) ингибирует пролиферацию активированных Т-клеток;

(v) ингибирует продуцирование и/или секрецию одного или нескольких воспалительных цитокинов;

(vi) не ингибирует продуцирование и/или секрецию ИЛ-2;

(vii) повышает продуцирование кетонов мочи;

(viii) повышает время выживания;

(ix) уменьшает отторжение трансплантата;

(x) повышает долю или активность регуляторных Т (Treg) клеток;

(xi) повышает долю $CD4^+$ Т-клеток, которые представляют собой Treg;

(xii) уменьшает долю $IgG1^+$ В-клеток;

(xiii) уменьшает долю В-клеток зародышевого центра;

(xiv) не ингибирует транспорт лактата в эритроцитах человека;

(xv) уменьшает активацию Т-клеток; а также

(xvi) уменьшает активность цитотоксических Т-клеток.

97. Способ по любому из пп. 88-96, который используют для лечения или предупреждения, по меньшей мере, одного из: системной красной волчанки, отторжения трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (GVHD), сахарного диабета 1 типа или 2 типа или ожирения.

98. Способ по любому из пп. 88-97, отличающийся тем, что эффективность лечения контролируют с помощью измерения кетонов мочи, повышения количества TR1 клеток, снижения или повышения экспрессии биомаркера, выбранного из воспалительного цитокина, ИФНγ, GM-CSF, ФНОα, ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-2, TIGIT, PD1, гранзима В, путем уменьшения количества эффекторных Т-клеток и/или $hCD3^+$ клеток, подавления пролиферации МКПК или комбинации любого из вышеизложенного.

99. Способ оценки терапевтической эффективности анти-MCT1 антагонистического антитела, которые включают в себя обнаружение его эффекта *in vitro* или *in vivo* в отношении любого из вышеизложенного: кетонов мочи, количества TR1 клеток, экспрессии биомаркера, выбранного из воспалительного цитокина, ИФНγ, GM-CSF, ФНОα, ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-2, TIGIT, PD1, гранзима В, уменьшения количества эффекторных Т-клеток и/или $hCD3^+$ клеток, подавления пролиферации МКПК или комбинации любого из вышеизложенного.

100. Способ лечения или предупреждения повторного развития рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически или профилактически эффективного количества анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитого полипептида, химерного антигенного рецептора (CAR), мультиспецифического антигенсвязывающего полипептида или полипептида

мультиспецифического или биспецифического антитела по любому из предыдущих пунктов, или клетка, которая экспрессирует, по меньшей мере, одно из вышеизложенного, или фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически или профилактически эффективное количество любого из вышеизложенного.

101. Способ по п. 100, отличающийся тем, что опухолевые клетки экспрессируют MCT1.

102. Способ по любому из пп. 88-101, отличающийся тем, что субъект представляет собой млекопитающее.

103. Способ по п. 102, отличающийся тем, что млекопитающее представляет собой человека, не человекообразного примата или грызуна.

104. Способ ингибирования или снижения активности активированных Т-клеток или В-клеток, включающие приведение в контакт указанных активированных клеток с анти-MCT1 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или слитым полипептидом, химерным антигенным рецептором (CAR), мультиспецифическим антигенсвязывающим полипептидом или полипептидом мультиспецифического или биспецифического антитела, или клеткой, которая экспрессирует, по меньшей мере, одно из вышеизложенного по любому из предыдущих пунктов.

105. Способ по любому из пп. 88-104, отличающийся тем, что анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифического или биспецифического антитела, или клетку, которая экспрессирует, по меньшей мере, одно из вышеизложенного по любому из предыдущих пунктов вводят в качестве монотерапии.

106. Способ по любому из пп. 88-105, отличающийся тем, что анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый полипептид, химерный антигенный рецептор (CAR), мультиспецифический антигенсвязывающий полипептид или полипептид мультиспецифического или биспецифического антитела, или клетку, которая экспрессирует, по меньшей мере, одно из вышеизложенного по

любому из предыдущих пунктов вводят в комбинации с вторым терапевтическим агентом.

107. Способ по п. 106, отличающийся тем, что терапевтический агент выбирают из иммунодепрессивного лекарственного средства, химиотерапевтического агента, бигуанида, например, метформина или другого антидиабетического агента, или противовоспалительного агента.

108. Способ по п. 106, отличающийся тем, что указанный другой терапевтический агент представляет собой ингибитор митохондрий и/или бигуанид.

109. Способ по любому из пп. 106-108, отличающийся тем, что указанный другой терапевтический агент выбирают из иммунодепрессивного препарата, химиотерапевтического агента, бигуанида, например, метформина или другого антидиабетического агента, или противовоспалительного агента, или указанный другой терапевтический агент представляет собой ингибитор митохондрий и/или бигуанид, или указанный другой терапевтический агент выбирают из метформина, фенформина, алексидина, бисбигуанида, буформина, хлоргексидина, хлорпрогуанила, фенилбигуанида, полиаминопропилбигуанида, полигексанида, мороксидина, глипизида, глибурида, репаглинида, саксаглиптина, ситаглиптина, пирвиниума памоата, прогуанила, доксициклина, атовакуона, канаглифлозина, глитазонов (например, троглитазона, пиоглитазона, розиглитазона), тайгециклина, тиазолидов (например, нитазоксанида), салициланилидов (например, клозантела, оксиклозанида, никлозамида), пергексилина, пропонолола, фенофибрата, миконазола, нефазодона, пентамидина, гидрокортизона, метайодбензилгуанидина, лонидамина, альфа-токоферилсукцината (первичная форма витамина Е), угольной ангидразы, ME344 (MEI Pharma), ингибиторов HIF1a (например, хризина, хетомина, диметил-бисфенола А, BAY84-2243), SR13800, диметилоксалоилглицина (DMOG), карбонилцианида п-трифторметоксифенилгидразона (FCCP), карбонилцианид м-хлорфенилгидразона (CCCP), антимицина А, олигомицина, салиномицина, динитрофенола, ротенона, фенформина, тирфостина 9, атпенина А5, берберина, азида, цианида, закиси азота, триоксида мышьяка, пирвиния, канаглифлозина, росиглитазона,

амобарбитала, хонокиола, арктигенина, сложного фенилового эфира кофеиновой кислоты, перфеназина, трифлуоперазина, метилглиоксаля и комбинаций, содержащих любое из вышеизложенного.

110. Способ по любому из пп. 88-109, отличающийся тем, что антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок или фармацевтическую композицию вводят энтерально, парентерально или местно.

111. Способ контроля эффективности лечения антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или слитым белком, который связывается с MCT1 и снижает MCT1-опосредованный транспорт лактата, включающие измерение уровня кетонов мочи.

112. Способ диагностики патологического состояния, выбранного из аутоиммунного, воспалительного или аллергического патологического состояния; рака; EIHI; поликистозного заболевания почек (ADPKD); сахарного диабета или другого нарушения обмена веществ, и/или патологического состояния, ассоциированного с повышением регуляции MCT1, при этом указанный способ включает:

(i) выделение клеток, ответственных за опосредование патологического состояния;

(ii) приведение в контакт указанных клеток с анти-MCT1 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или MCT1-связывающим слитым белком; а также

(iii) определение уровня анти-MCT1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или MCT1-связывающего слитого белка, связанного с указанными клетками.

113. Способ по п. 111 или п. 112, отличающийся тем, что патологическое состояние представляет собой аутоиммунное, воспалительное патологическое состояние, отторжение трансплантата, GVHD, нарушение обмена веществ (например, сахарный диабет), EIHI; поликистозное заболевание почек (ADPKD); или аллергическое патологическое состояние.

114. Способ по п. 112, отличающийся тем, что патологическое состояние представляет собой аутоиммунное, воспалительное патологическое состояние, отторжение трансплантата, GVHD, нарушение обмена

веществ (например, сахарный диабет), поликистозное заболевание почек (ADPKD); или аллергическое патологическое состояние, а клетки представляют собой активированные Т-клетки или В-клетки.

115. Способ по п. 112, отличающийся тем, что патологическое состояние представляет собой рак, а клетки представляют собой опухолевые клетки.

116. Способ по п. 112, отличающийся тем, что патологическое состояние представляет собой EIHI, а клетки представляют собой бета-клетки.

117. Способ по любому из пп. 88-116, отличающийся тем, что анти-MCT1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или MCT1-связывающий слитый белок включает в себя/содержит одно или несколько из следующего (следующих свойств):

(i) конкурирует с анти-MCT1 антителом, выбранным из любого из Ат1-Ат95 или другого анти-MCT1 антитела, содержащего те же самые CDR, что и любое из вышеуказанных анти-MCT1 антител;

(ii) содержит те же самые CDR, что и антитело против MCT1 человека, выбранное из Ат1-Ат95;

(iii) содержит аффинно-зрелый или гуманизированный вариант антитела против MCT1 человека, выбранного из Ат1-Ат95;

(iv) конкурирует с антителом, содержащим домен V_H, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена V_H Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 2), или с любым из Ат1-Ат59; и содержащим домен V_L, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена V_L Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 3), или с любым из Ат2-Ат95.

(v) содержит последовательности CDR тяжелой цепи Ат1 к MCT1 (SEQ ID NOS: 4, 5, 6) и последовательности CDR легкой цепи Ат1

к MCT1 (SEQ ID NOS: 7, 8, 9) или последовательности любого из Ат2-Ат95;

(vi) конкурирует с антителом, содержащим или представляющим собой домен V_H, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена V_H Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 2), или с любым из Ат2-Ат60; и представляющим собой домен V_L, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена V_L Ат1 к MCT1 (SEQ ID NO: 3), или с любым из Ат2-Ат60;

(vii) конкурирует с антителом, содержащим или представляющим собой домен V_H, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена V_H, выбранного из антител SEQ ID NO: 2, 12, 14, 16, 19-32, или с любым из Ат5-Ат60; и/или

(viii) конкурирует с антителом, содержащим или представляющим собой домен V_L, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности по отношению к аминокислотной последовательности домена V_L, выбранного из антител SEQ ID NO: 13, 15, 17, 33-44, или с любым из Ат5-Ат60; и/или

(ix) содержит, по меньшей мере, один пептид, содержащий последовательность, идентичную последовательности SEQ ID NO: 6, или содержащую последовательность, которая отличается от нее не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток, при этом указанный пептид прямо или косвенно связан с другим полипептидом, например, полипептидом антитела или доменом

антитела, сывороточным альбумином, сывороточным альбумином человека или других приматов, аднектином, аффителом, DARPin, антикалином, гликолем (ПЭГ), монометокси-ПЭГ (мПЭГ), молекулой XTEN, молекулой или фрагментом rPEG или вариантом любого из вышеизложенного.

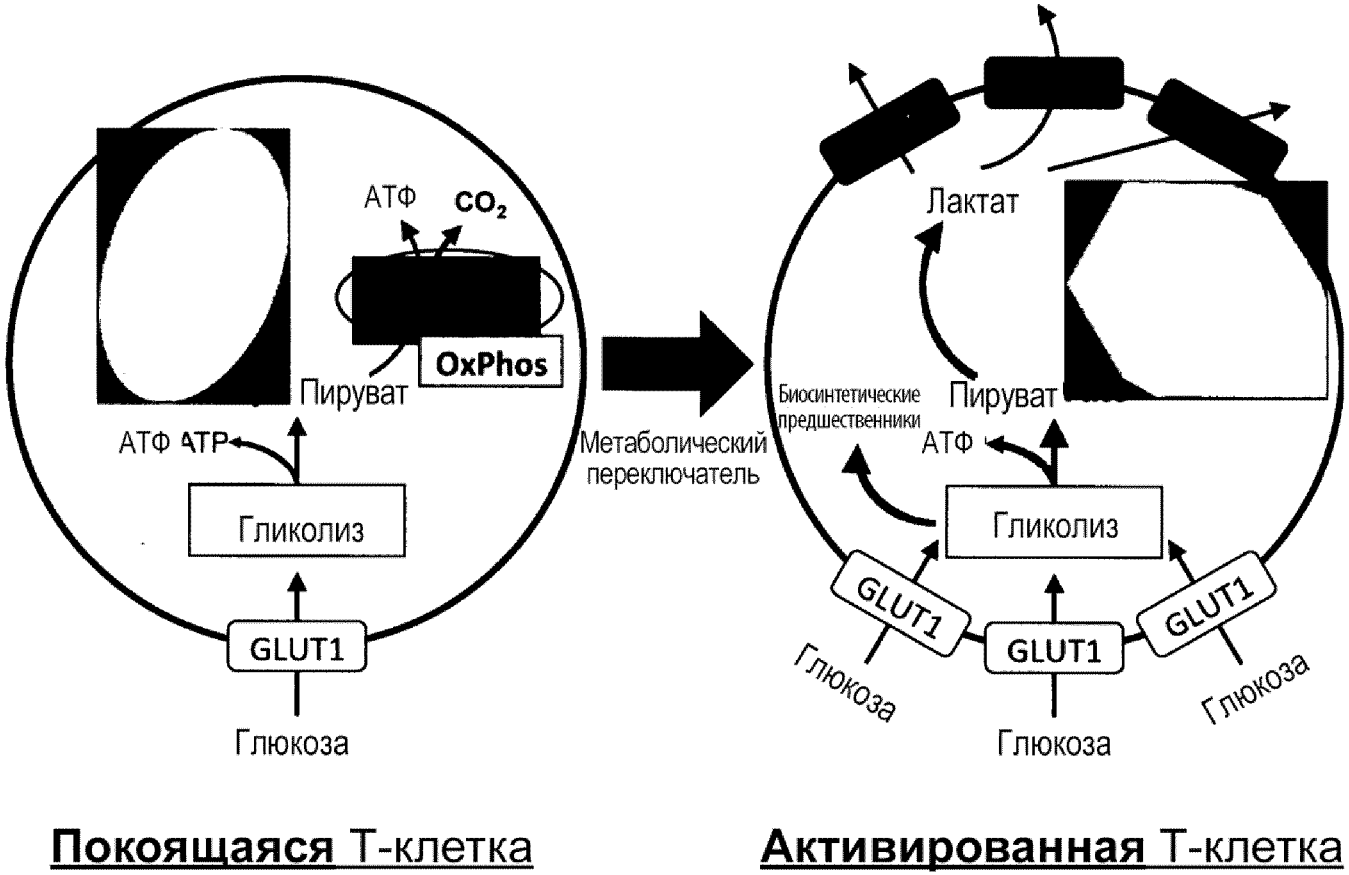
118. Способ обнаружения экспрессии MCT1, необязательно функционального MCT1, в клетке, включающий определение того, связывается ли какое-либо из анти-MCT1 антител по любому из предыдущих пунктов с MCT1, экспрессируемым указанной клеткой.

119. Способ по п. 118, отличающийся тем, что клетка не человеческая.

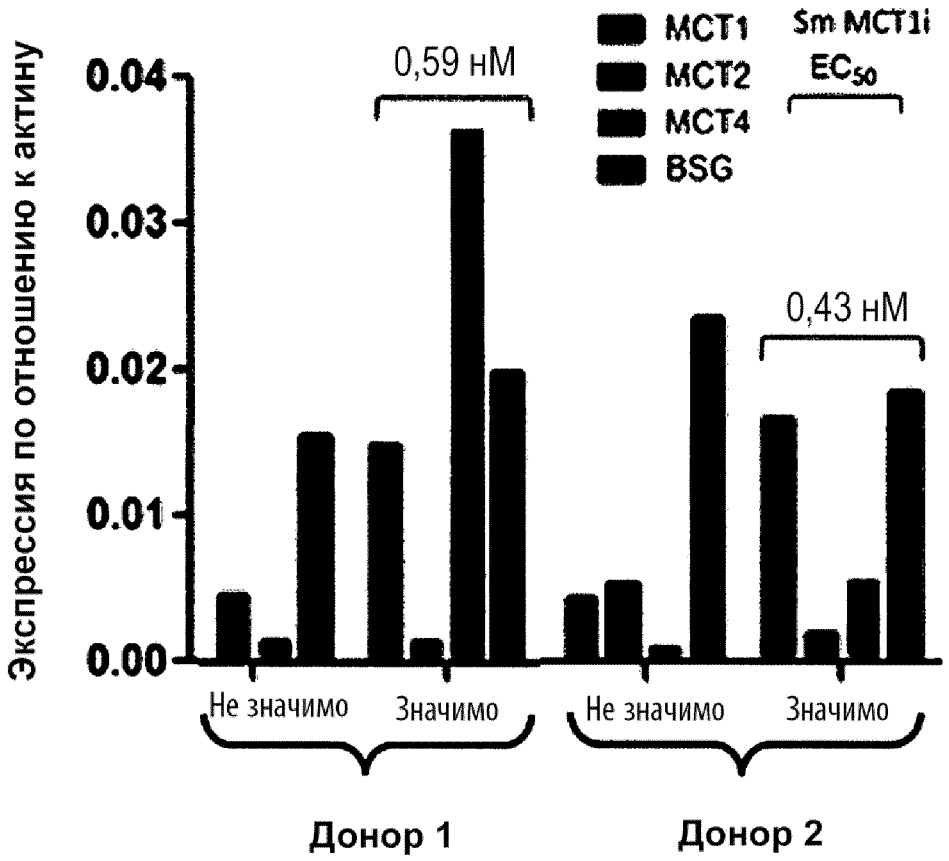
120. Способ по п. 118, отличающийся тем, что клетка не человеческая.

121. Способ по п. 118, отличающийся тем, что клетку получают от пациента, имеющего или предположительно имеющего аутоиммунное патологическое состояние, аллергическое патологическое состояние, воспалительное патологическое состояние, нарушение обмена веществ, рак, реципиента трансплантата, реципиента клеточной терапии, состояние EIHI, поликистозное заболевание почек (ADPKD).

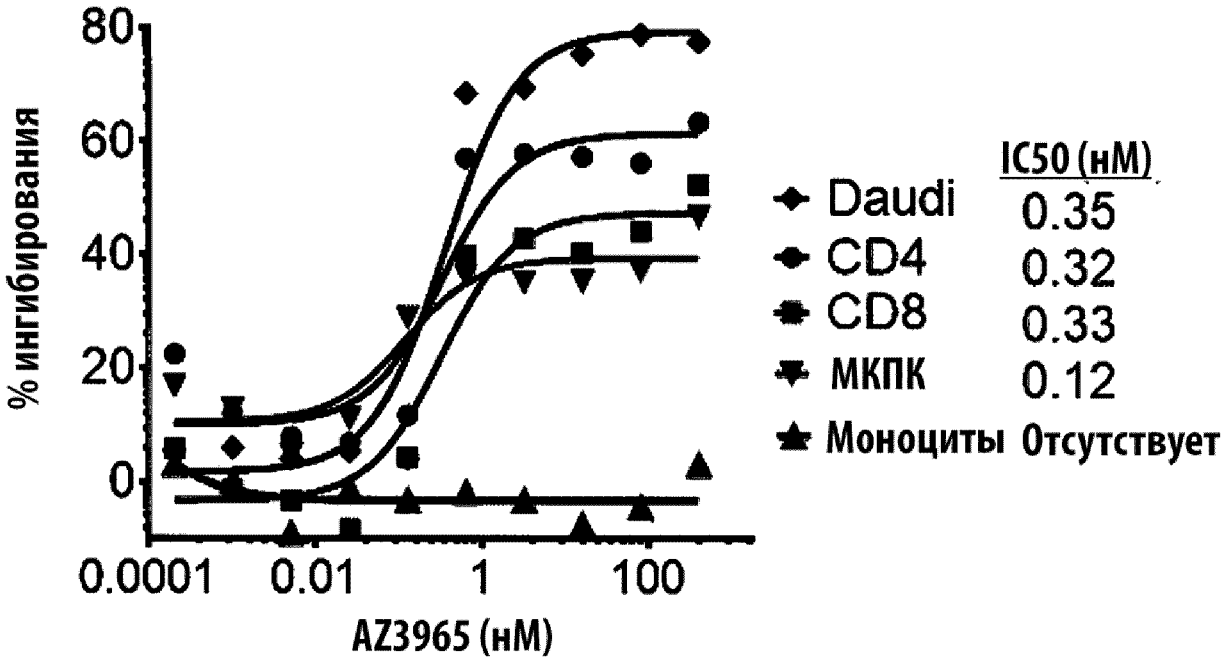
122. Способ по п. 118, отличающийся тем, что способ обнаружения используют для диагностики или контроля заболевания или прогноза заболевания с помощью клеточного образца, получаемого от пациента, имеющего или предположительно имеющего аутоиммунное патологическое состояние, аллергическое патологическое состояние, воспалительное патологическое состояние, нарушение обмена веществ, рак, реципиента трансплантата, реципиента клеточной терапии, состояние EIHI, поликистозное заболевание почек (ADPKD), характеризующихся клетками, которые имеют аберрантную (повышенную) экспрессию или активность MCT1.


АТФ
CO_2
OxPhos
Пируват
АТФ ATP
Гликолиз
GLUT1
Глюкоза
Метаболический переключатель
Лактат
Биосинтетические предшественники
Пируват
АТФ
Гликолиз
GLUT1
GLUT1
GLUT1
Глюкоза
Глюкоза
Глюкоза
Покоящаяся Т-клетка
Активированная Т-клетка

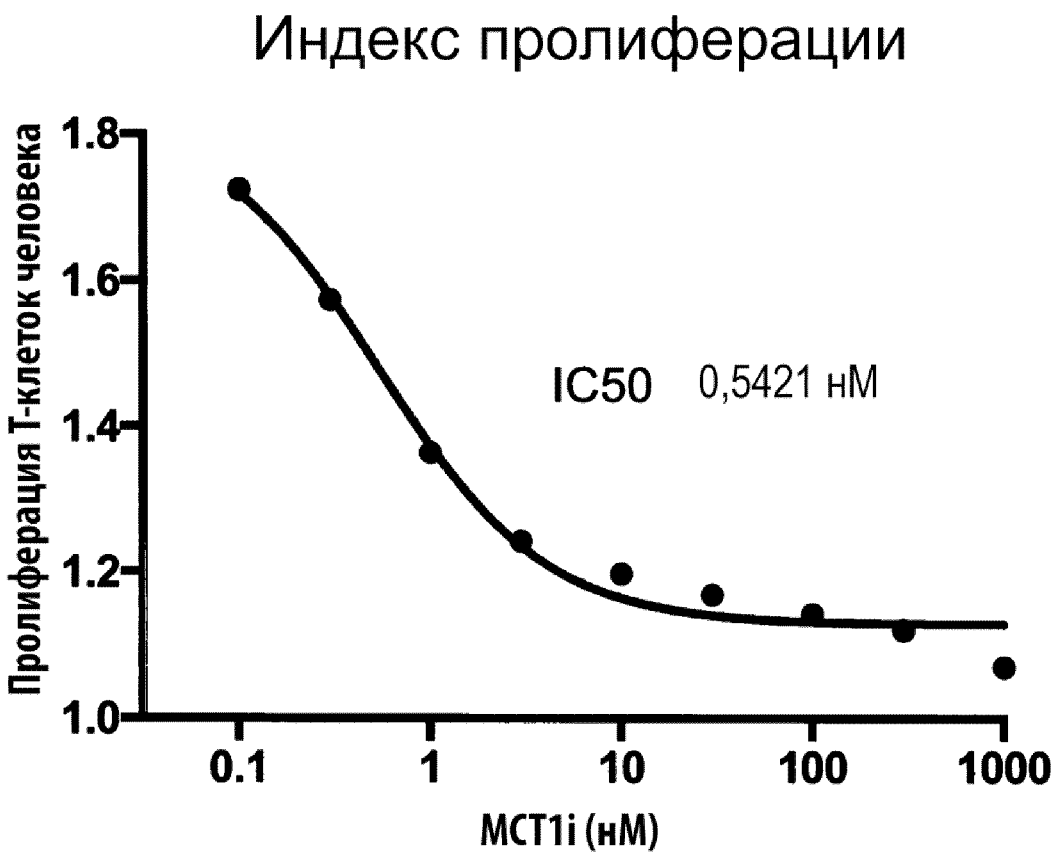
Фиг. 1


Экспрессия по отношению к актину
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
MCT1
MCT2
MCT4
BSG
Sm MCT1i
EC50
0,59 нМ
0,43 нМ
Не значимо
Значимо
Не значимо
Значимо
Донор 1
Донор 2

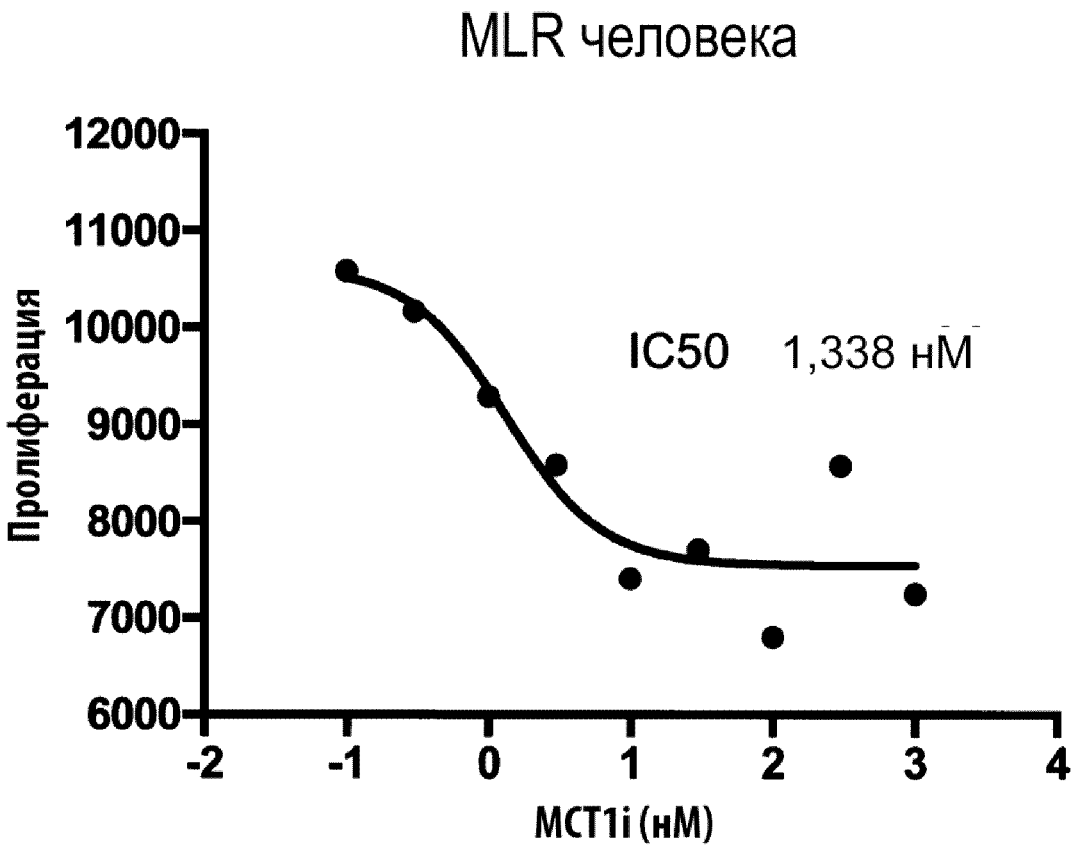
Фиг. 2


80
60
40
20
0
% ингибирования
0.0001
0.01
1
100
AZ3965 (нМ)
IC50 (нМ)
Daudi 0.35
CD4 0.32
CD8 0.33
МКПК 0.12
Моноциты Отсутствует

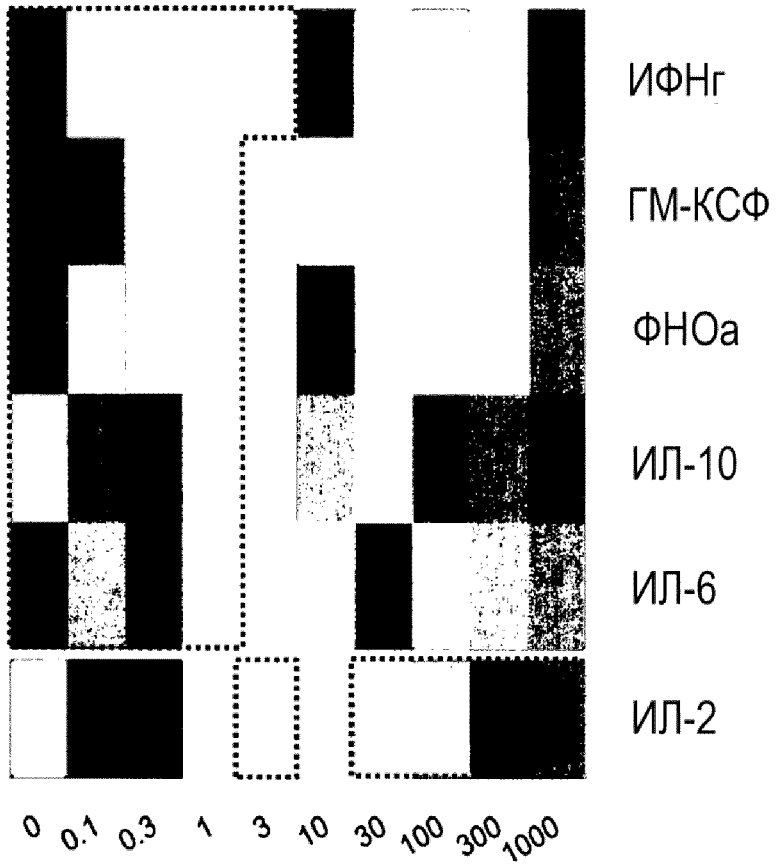
Фиг. 3


Индекс пролиферации
Пролиферация Т-клеток человека
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
IC50 0,5421 нМ
0.1
1
10
100
1000
MCT1i (нМ)

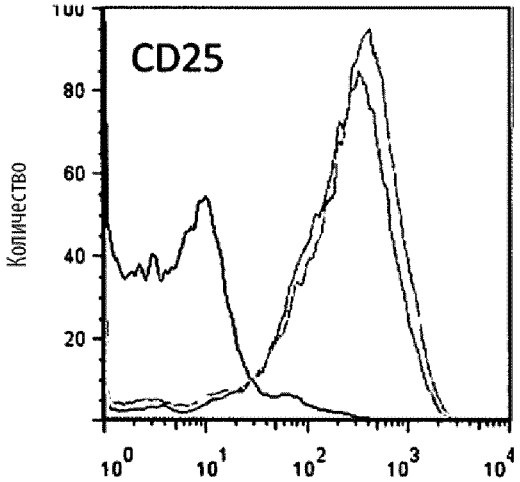
Фиг. 4


MLR человека
Пролиферация
12000
11000
10000
9000
8000
7000
6000
IC50 1,338 нМ
-2
-1
0
1
2
3
4
MCT1i (нМ)

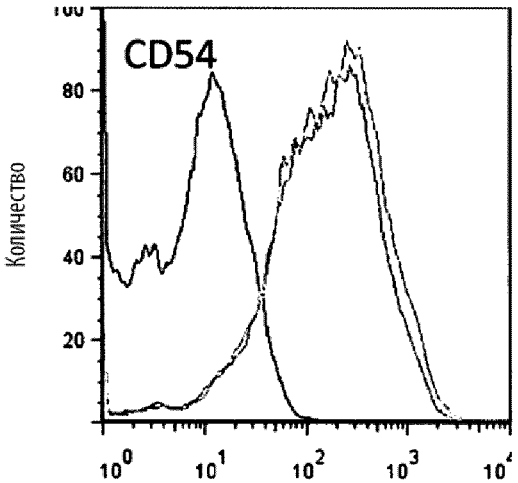
Фиг. 5



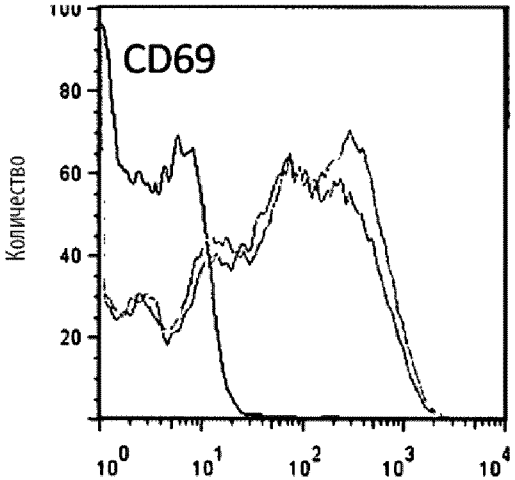
Фиг. 6



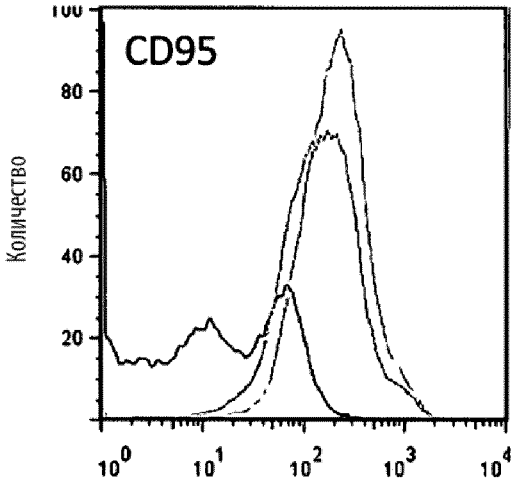
Фиг. 7A



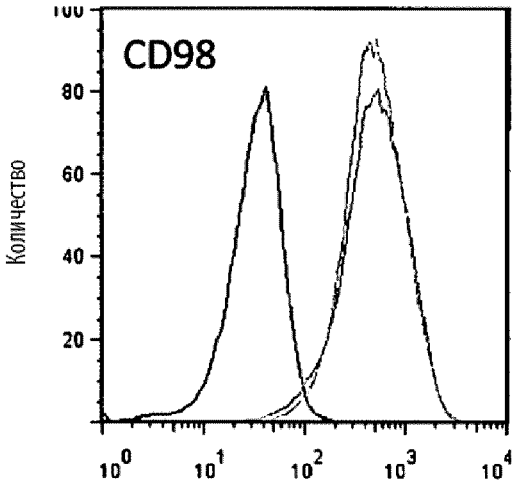
Фиг. 7B



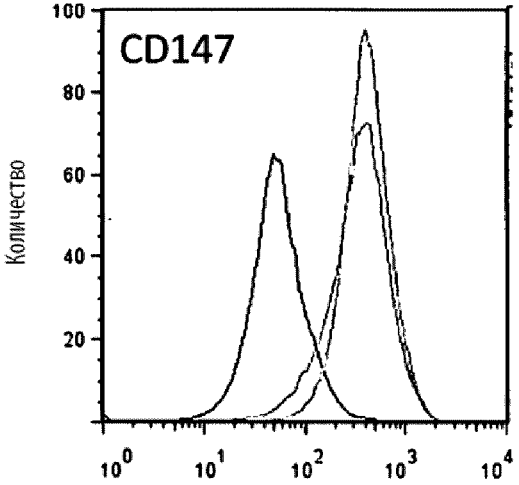
Фиг. 7C



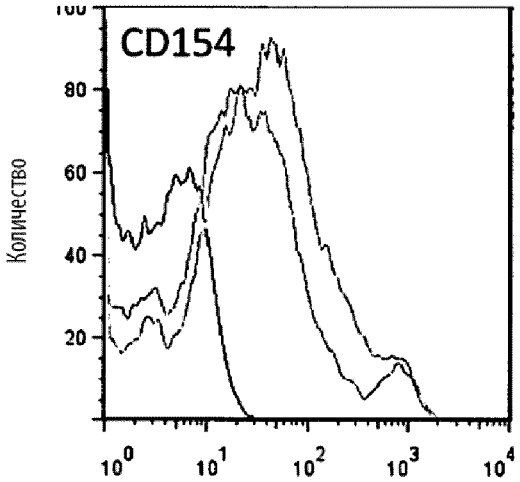
Фиг. 7D



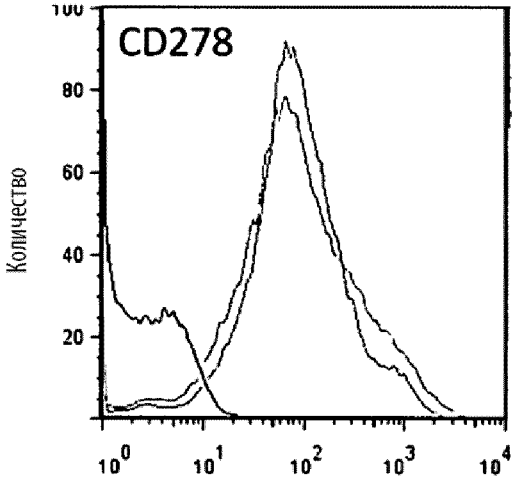
Фиг. 7E



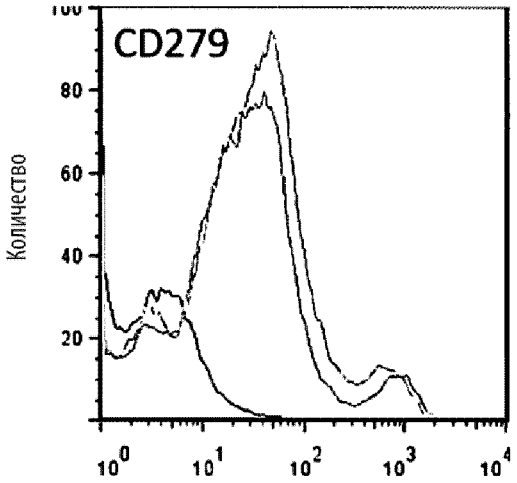
Фиг. 7F



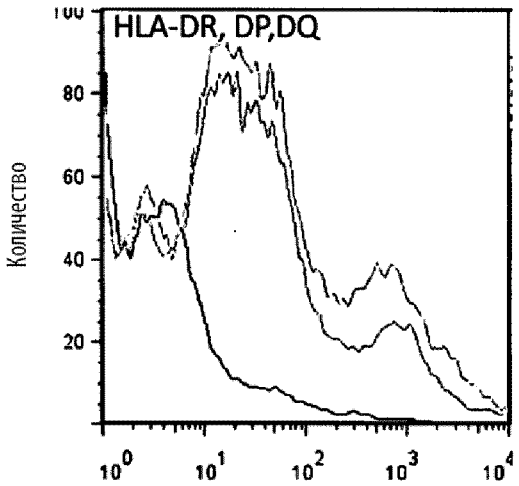
Фиг. 7G



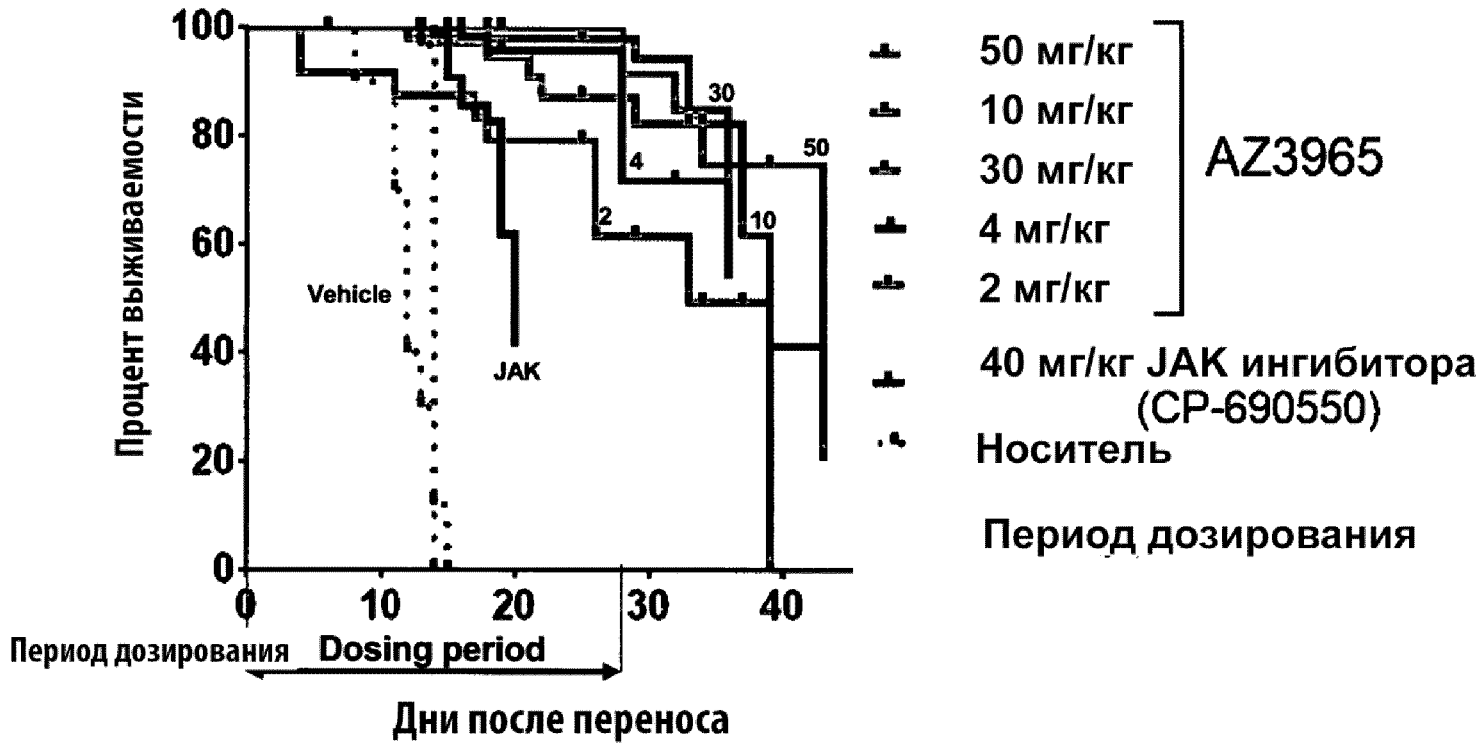
Фиг. 7H


CD279
Количество
100
80
60
40
20
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

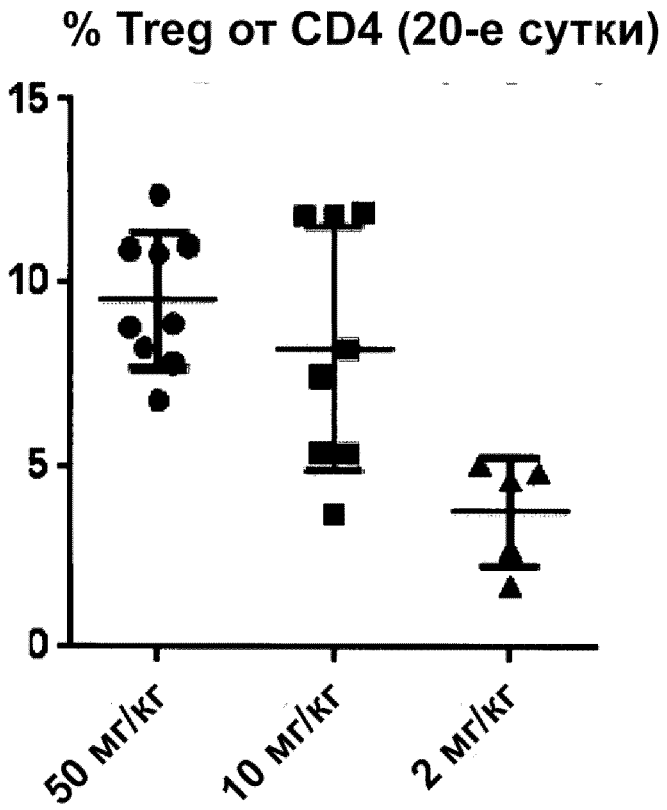
Фиг. 7I


HLA-DR, DP,DQ
Количество
100
80
60
40
20
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

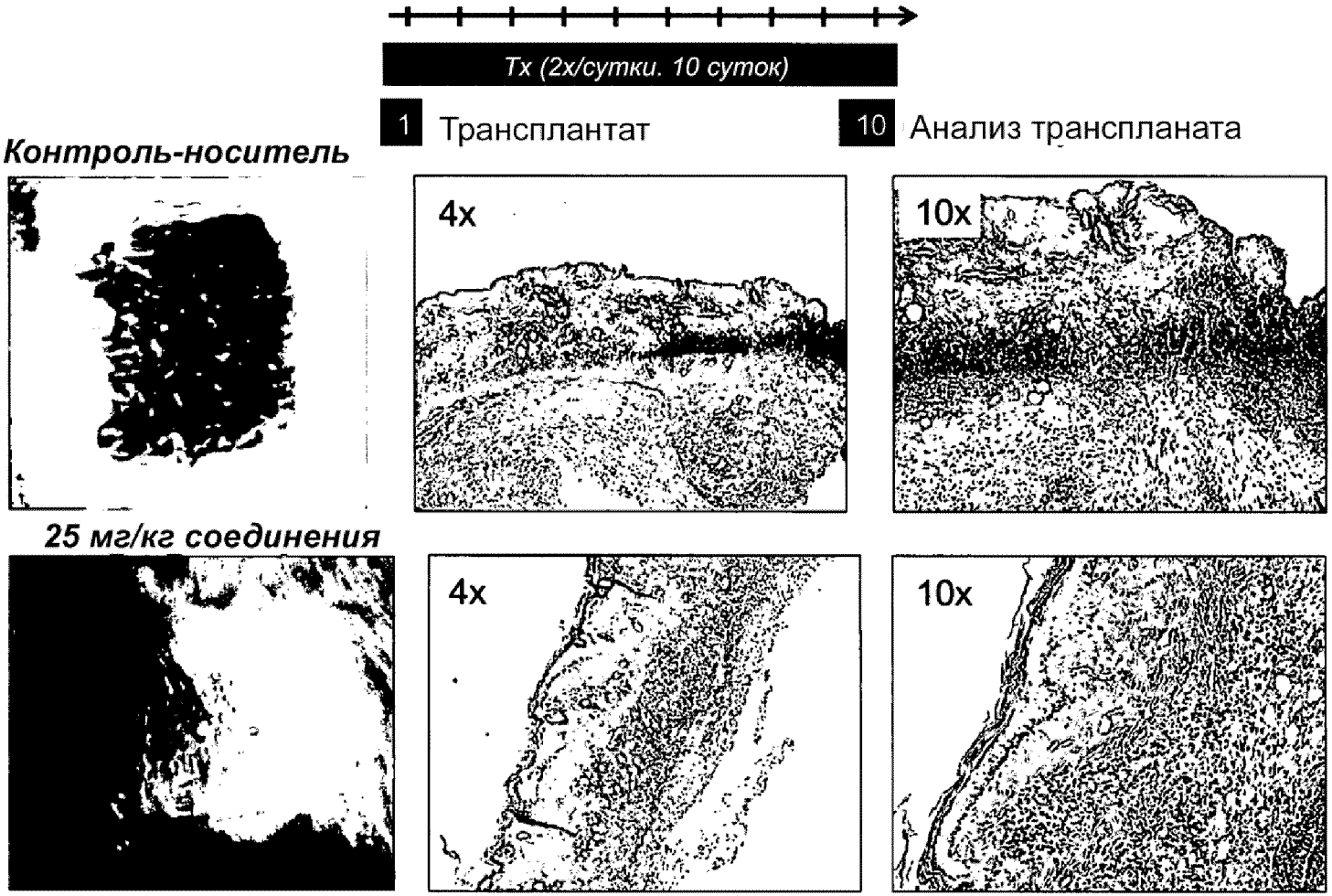
Фиг. 7J


Процент выживаемости
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
Период дозирования
Dosing period
Дни после переноса
Vehicle
JAK
2
4
10
30
50
50 мг/кг
10 мг/кг
30 мг/кг
4 мг/кг
2 мг/кг
AZ3965
40 мг/кг JAK ингибитора (CP-690550)
Носитель
Период дозирования

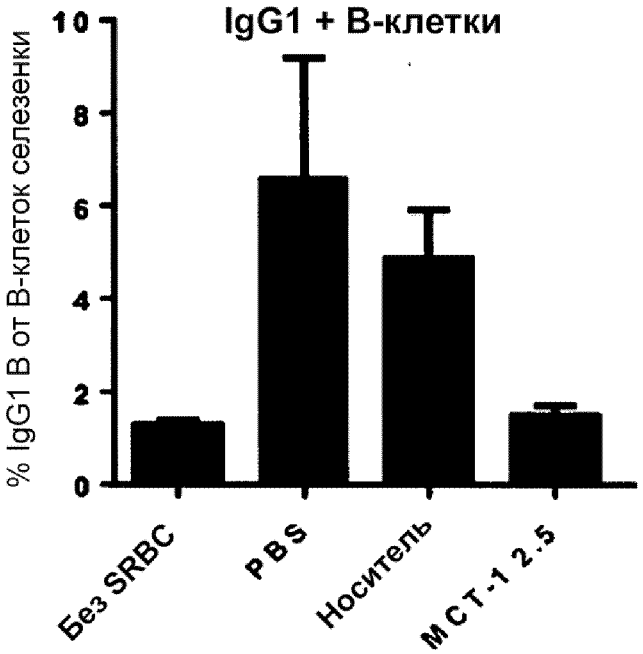
Фиг. 8



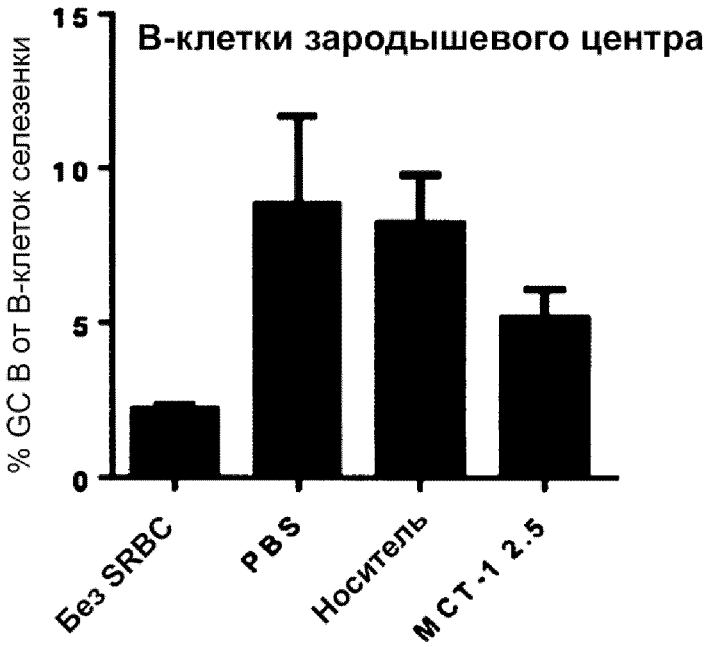
Фиг. 9


Tx (2x/сутки. 10 суток)
1 Трансплантат
10 Анализ транспланата
Контроль-носитель
4x
10x
25 мг/кг соединения
4x
10x

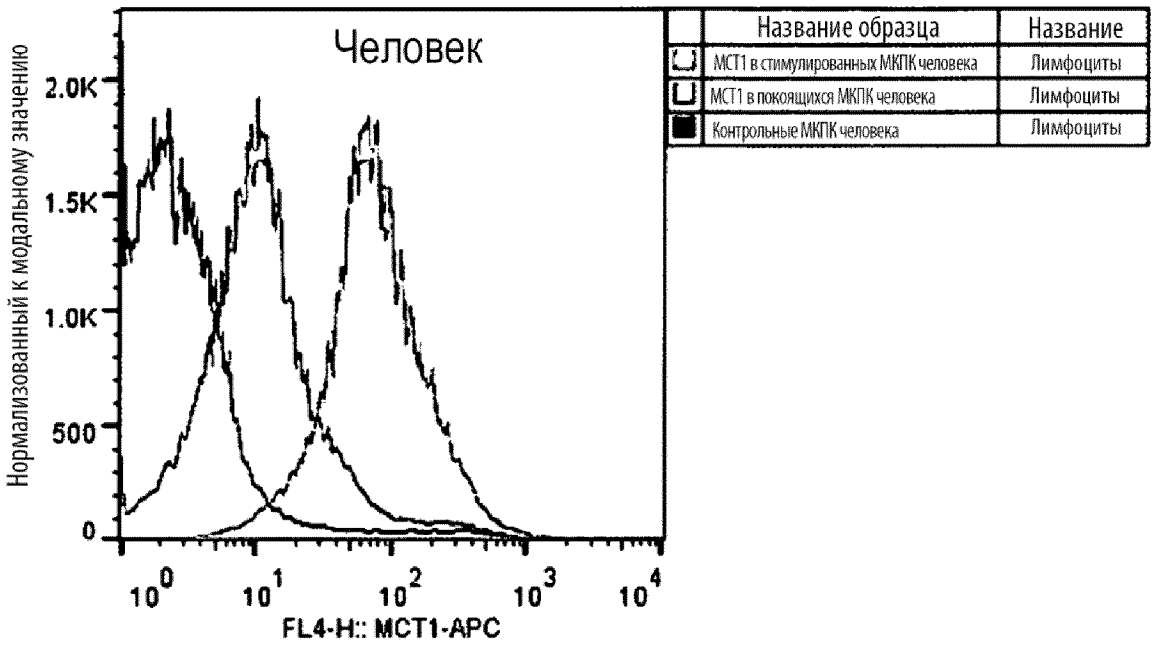
Фиг. 10



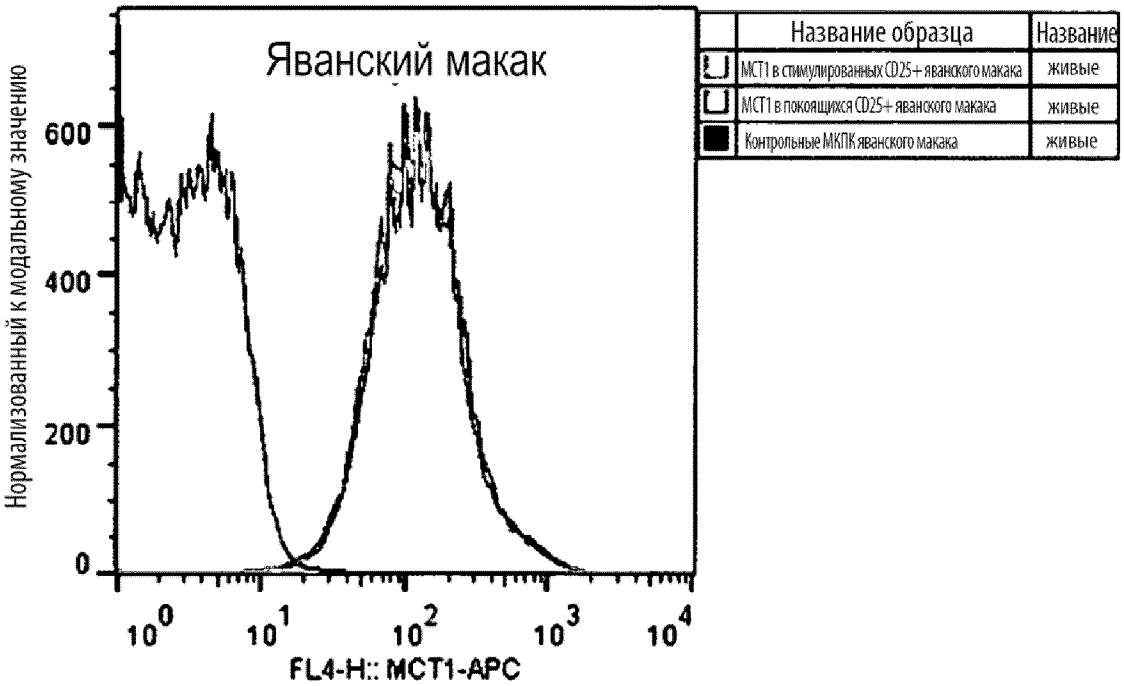
Фиг. 11A



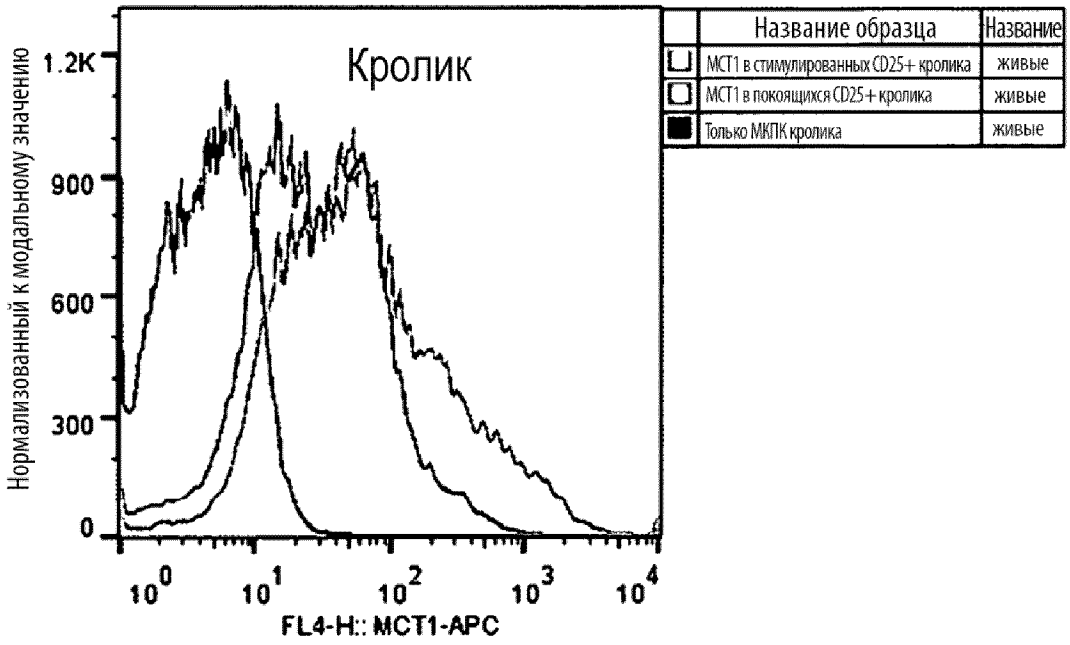
Фиг. 11B



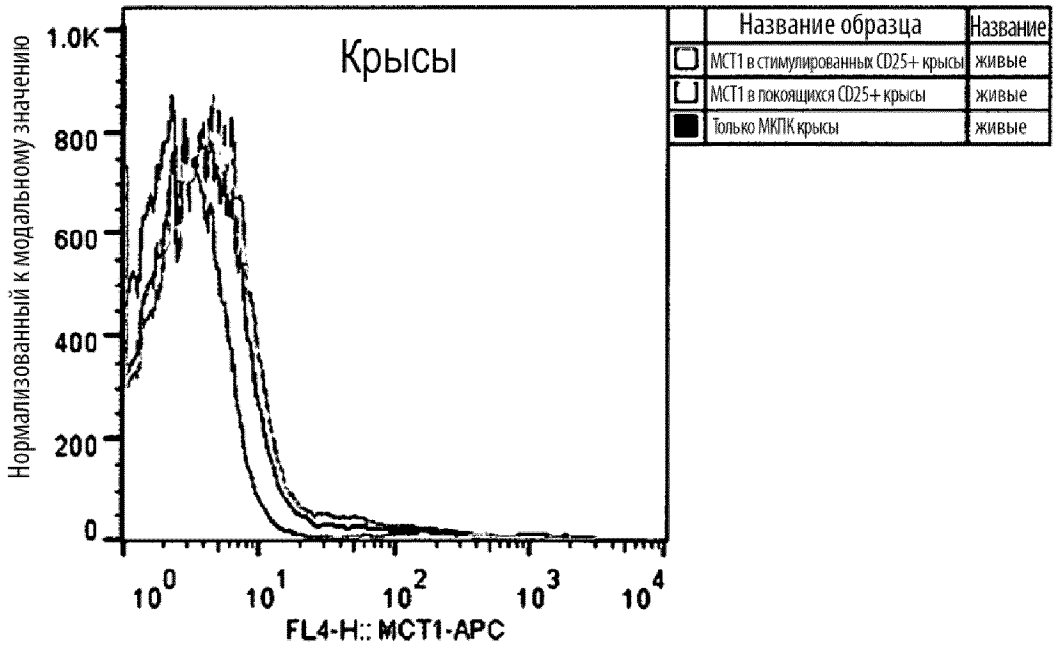
Фиг. 12A



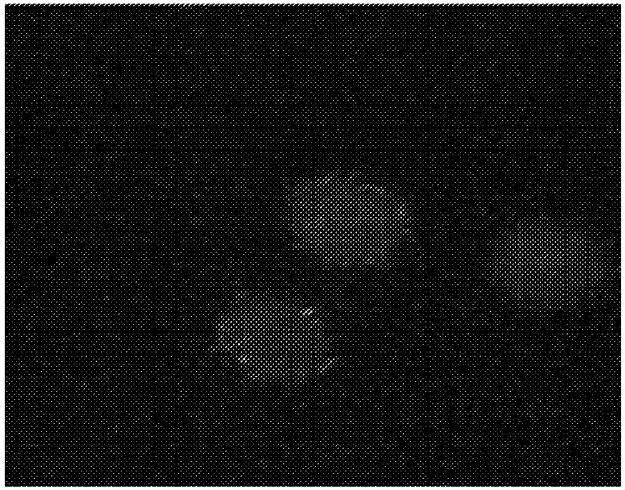
Фиг. 12B



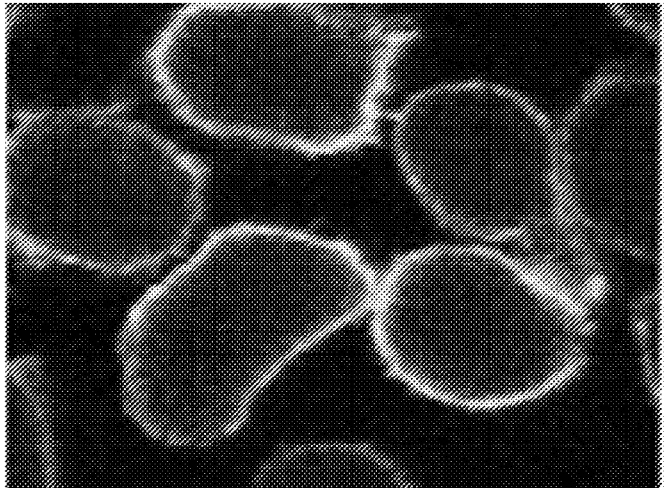
Фиг. 12C



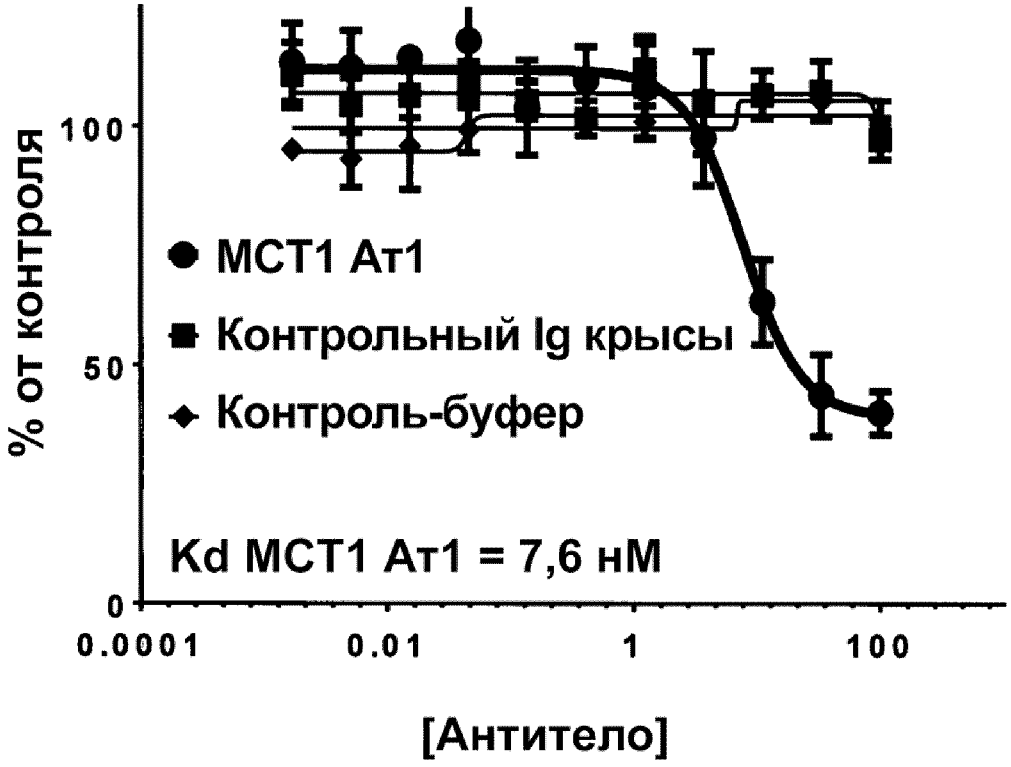
Фиг. 12D



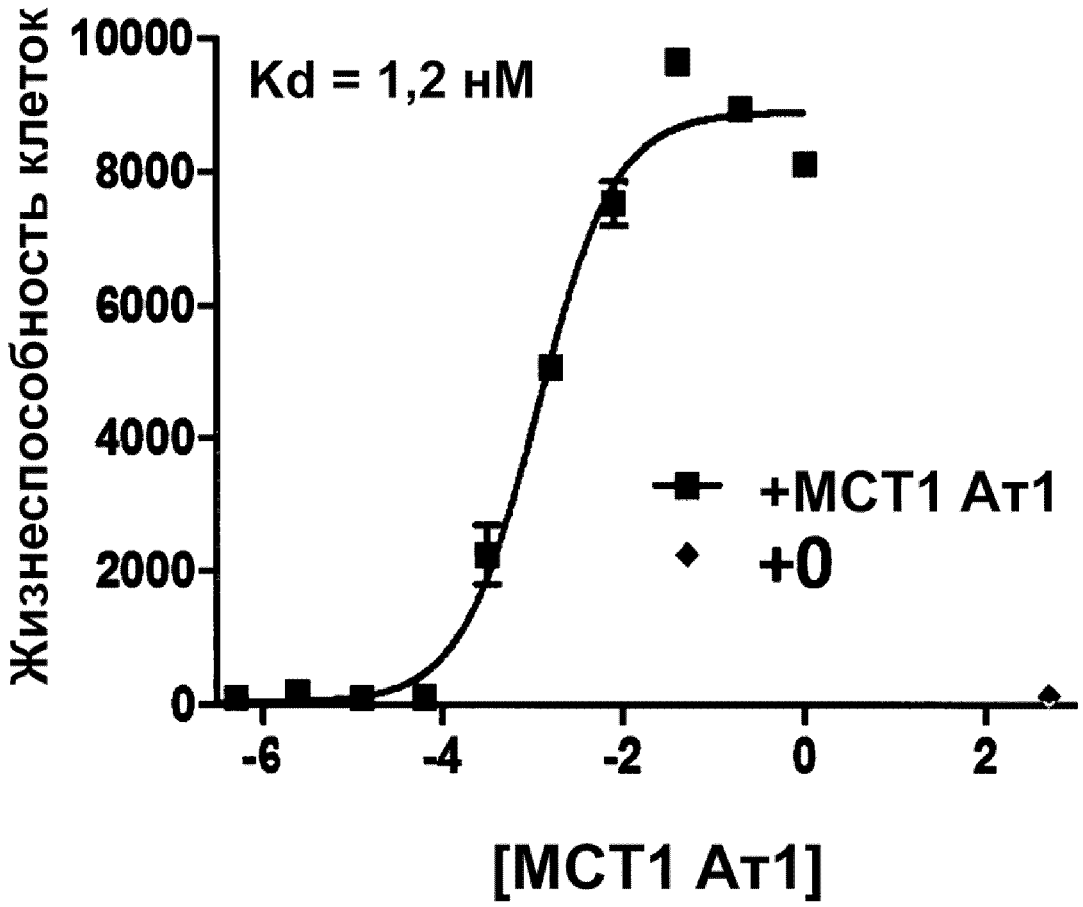
ФИГУРА 13A



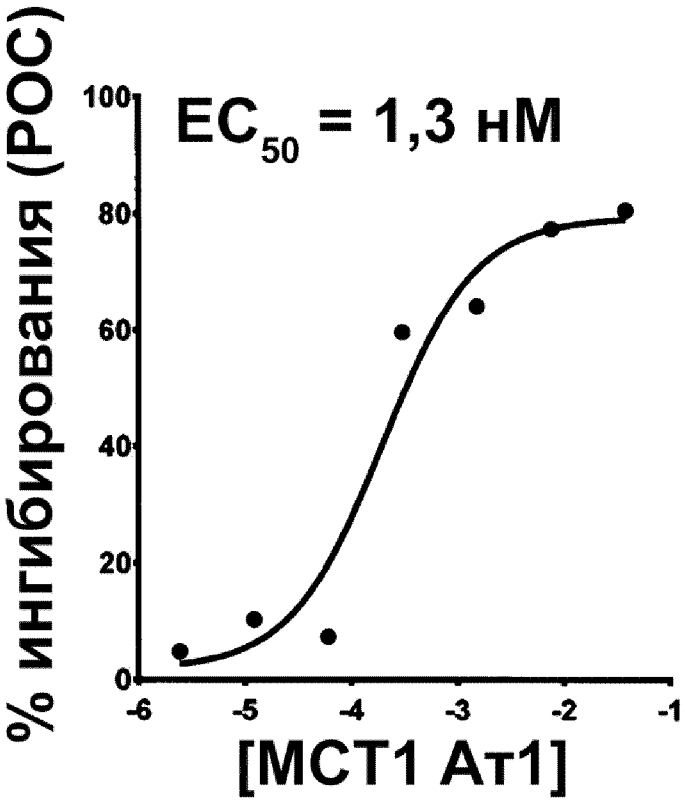
ФИГУРА 13B


% от контроля
100
50
0
MCT1 Ат1
Контрольный Ig крысы
Контроль-буфер
Kd MCT1 Ат1 = 7,6 нМ
0.0001
0.01
1
100
[Антитело]

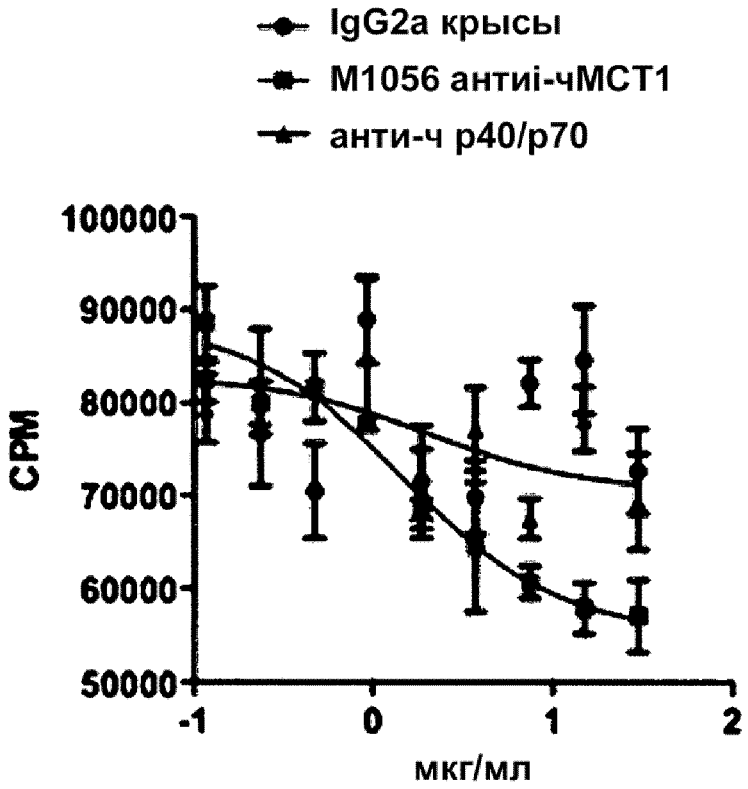
Фиг. 14


Жизнеспособность клеток
10000
8000
6000
4000
2000
0
Kd = 1,2 нМ
+MCT1 Ат1
+0
-6
-4
-2
0
2
[MCT1 Ат1]

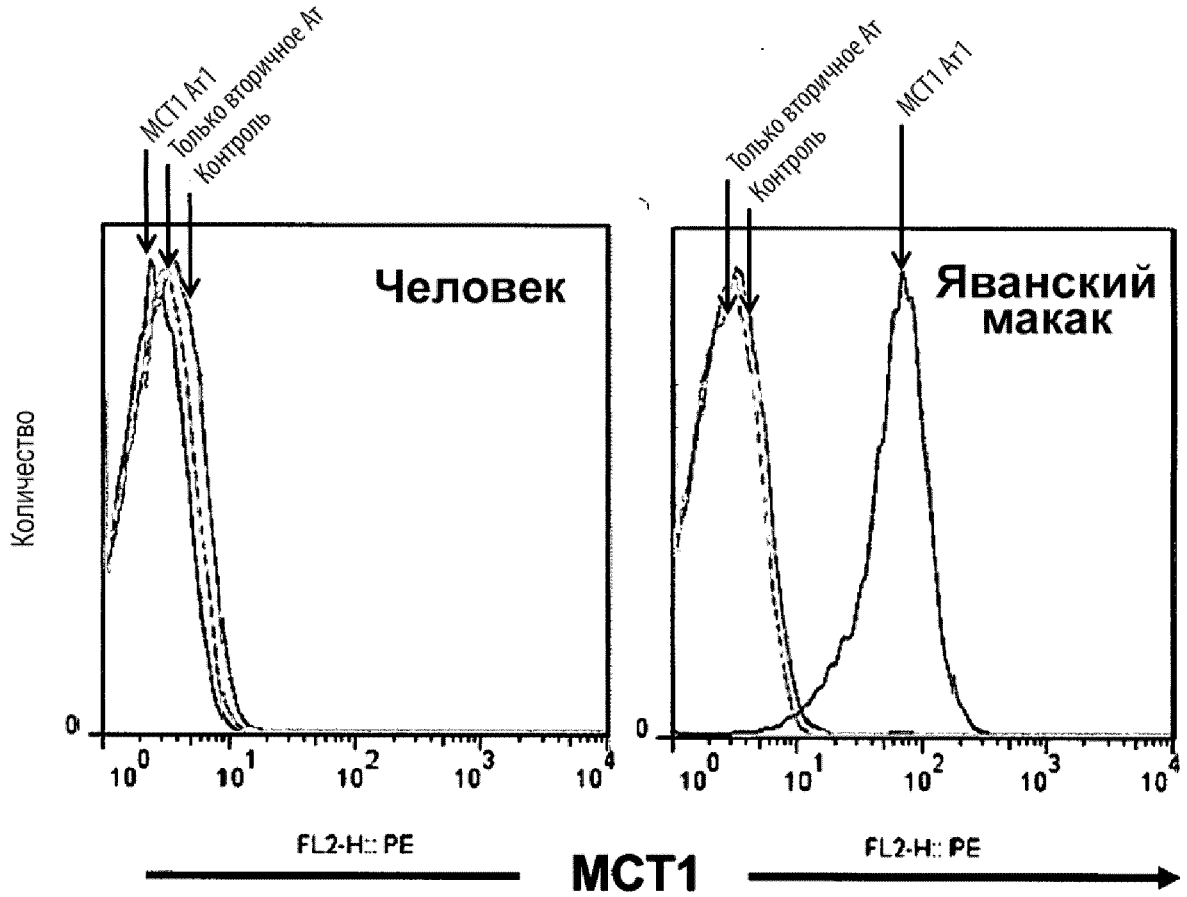
Фиг. 15



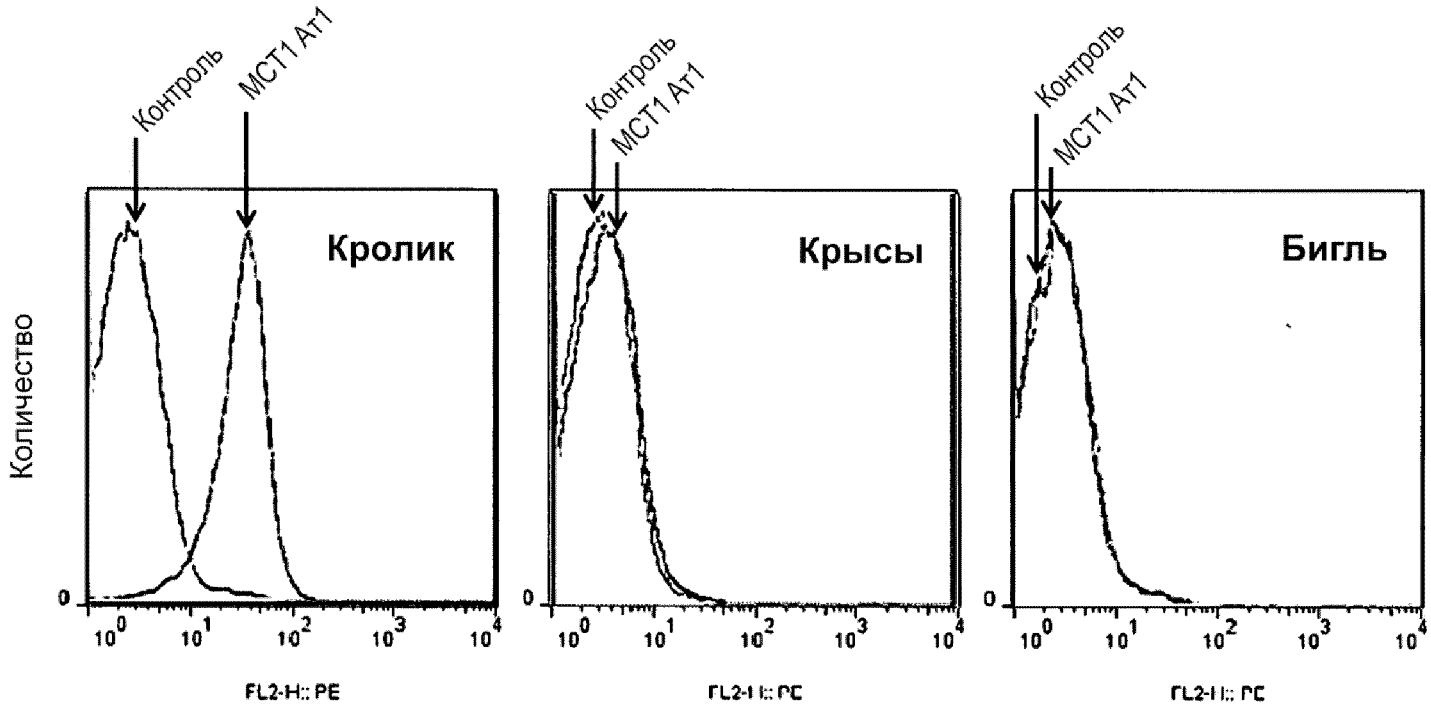
Фиг. 16


IgG2a крысы
M1056 антиі-чМСТ1
анти-ч p40/p70
100000
90000
80000
70000
60000
50000
CPM
-1
0
1
2
мкг/мл

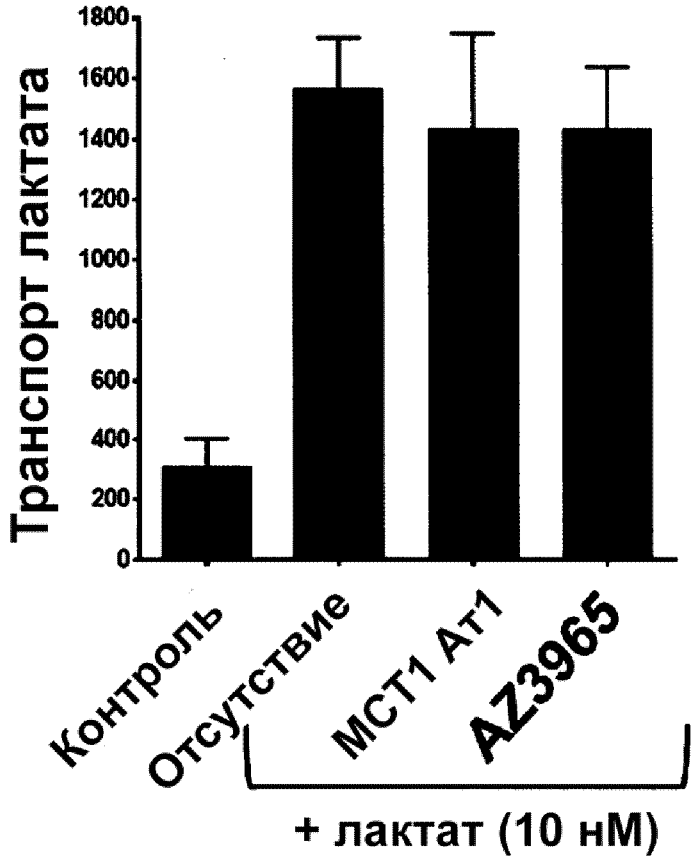
Фиг. 17


MCT1 Ат1
Только вторичное Ат
Контроль
Человек
Количество
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-H:: PE
Только вторичное Ат
Контроль
MCT1 Ат1
Яванский макак
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-H:: PE
MCT1

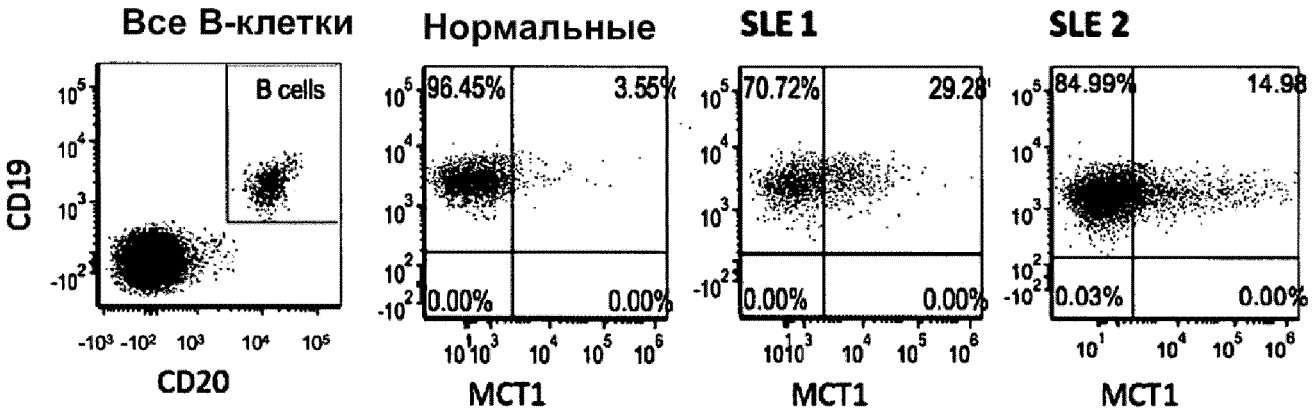
Фиг. 18A


Контроль
MCT1 Ат1
Кролик
Количество
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4
FL2-H:: PE
Контроль
MCT1 Ат1
Крысы
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4
Контроль
MCT1 Ат1
Бигль
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4

Фиг. 18B


Транспорт лактата
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Контроль
Отсутствие
MCT1 Ат1
AZ3965
+ лактат (10 нМ)

Фиг. 19


Все В-клетки
Нормальные
SLE 1
SLE 2
B cells
CD19
CD20
MCT1
96.45%
3.55%
0.00%
0.00%
70.72%
29.28
0.00%
0.00%
84.99%
14.98
0.03%
0.00%

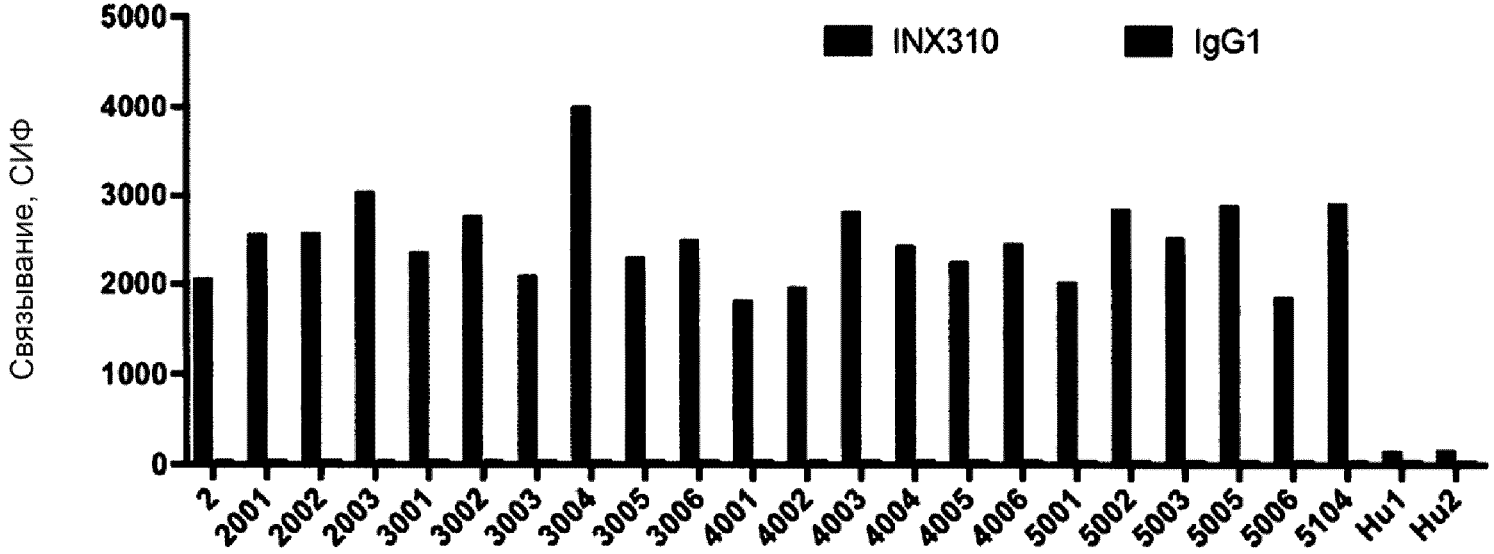
Фиг. 20

Фиг. 21

Фиг. 22. **Резервные пути, не допускающие токсичности за пределами лимфатической системы**

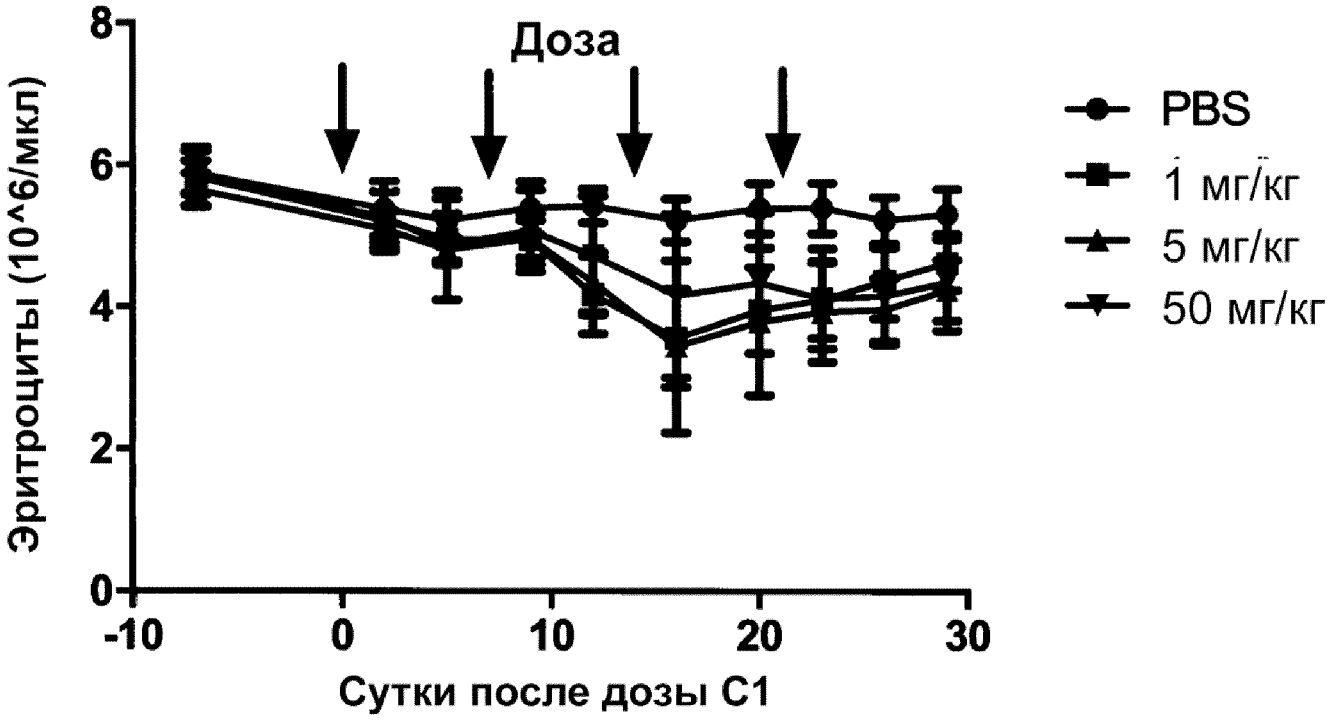
	Орган	Переносчик лактат/пируват					
		MCT1	MCT2	MCT3	MCT4	SMCT1	SMCT2
Единственный транспортный путь, который обеспечивает эффективность в лимфоидной системе							
	В-клетки и Т-клетки	■					
Резервные пути, не допускающие токсичности в других местах							
	Врожденная иммунная система	■	■		■		
	Печень	■	■		■		
	Мышечная ткань	■	■		■		
	Сердце	■	■		■		
	Легкое	■	■		■		
	Кишечник	■			■	■	■
	Головной мозг	■			■		
	Почка	■	■			■	■
	Сетчатка	■	■	■	■		
		■	Экспрессирован				
			Экспрессирован, но не является обязательным для эффективности				
			Не экспрессирован				

Фиг. 23. **Эритроциты яванского макака экспрессируют высокие уровни MCT1**



- Экспрессия у яванского макака вызывает два вопроса:
  - Будут ли переносить яванские макаки лекарственный препарат?
  - Будет ли воздействие лекарственного препарата приемлемым у яванских макаков?

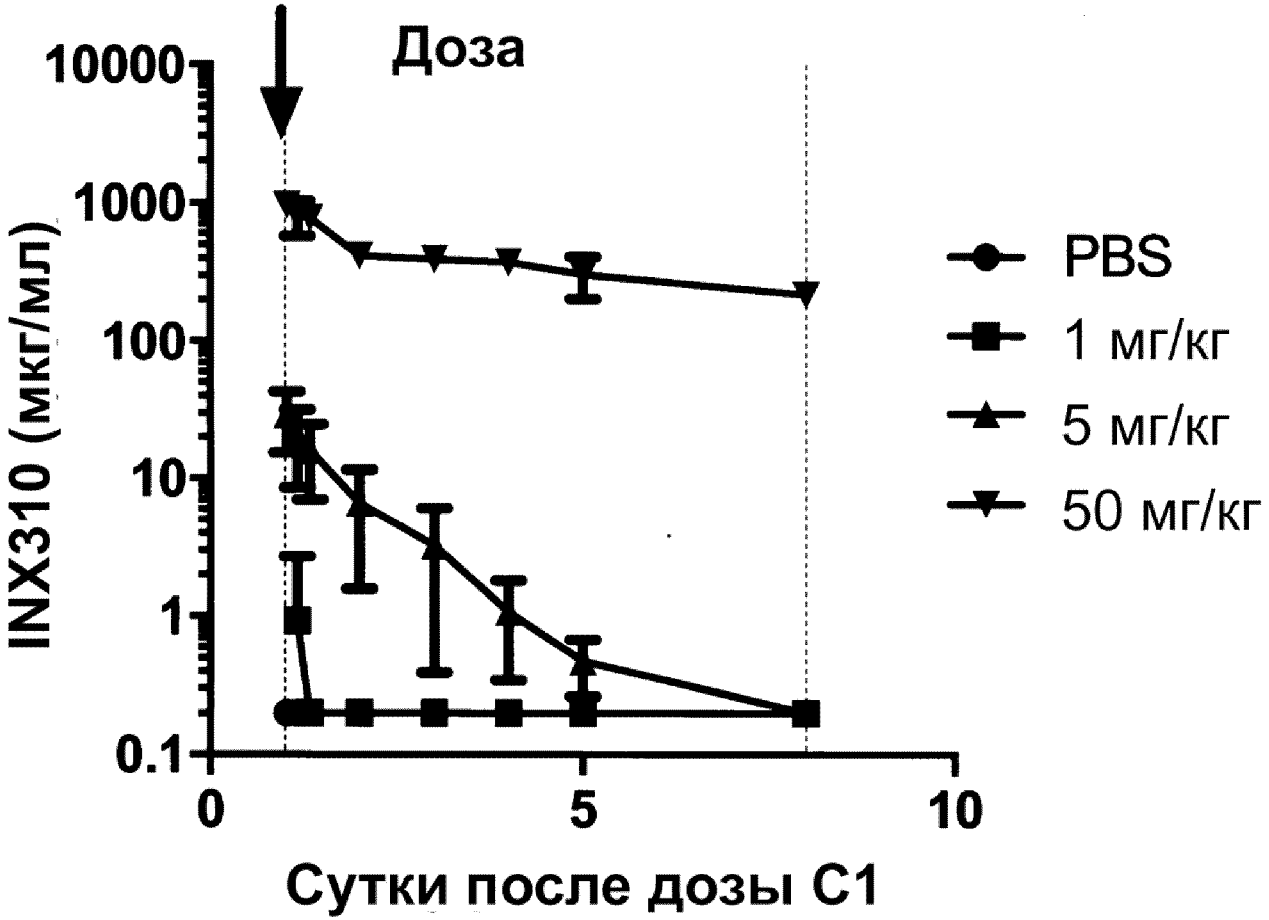
Фиг. 24. **Яванские макаки переносят повторное дозирование Ат1 при 50 мг/кг**



Снижение массы эритроцитов устраняется

2 из 18 животных на «лекарственных каникулах»

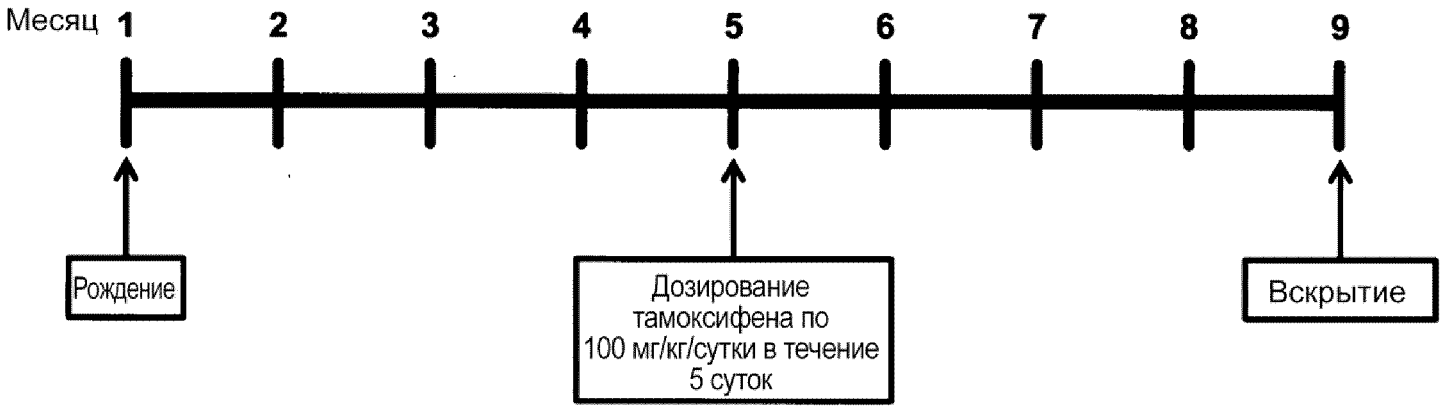
Фиг. 25. **Предварительные ФК данные у яванских макаков: достаточное воздействие**



При уровнях дозы Ат1 ≥ 5 мг/кг снижение эритроцитов является насыщенным

Фиг. 26. **Оценка целевых тканей у индуцированных тамоксифеном нокаутированных по МСТ-1 мышей**

- **4 самца мыши на группу**
  - 4 МСТ-1 fl/fl, Cre -/- (ДТ)
  - 4 МСТ-1 fl/fl, Cre +/+ (КО)
- **В возрасте 4 месяцев при дозировании тамоксифена**
- **В возрасте 8 месяцев при вскрытии**
  - Гистопатология некоторых тканей, идентифицированных при оценках предрасположенности
    - Глаза со зрительным нервом, семенники, сердце, скелетные мышцы (длинный разгибатель пальцев, камбаловидная мышца, поясничная мышца, диафрагма)
  - Показатели клинической биохимии некоторых параметров, имеющим отношение к оценкам предрасположенности
    - АЛТ, АСТ, ЩФ, Na, K, Ca, фосфор, Cl, общий белок, альбумин, соотношение альбумин/глобулин (рассчитанное), глобулин (рассчитанный), глюкоза, BUN, креатинин, общий билирубин, ГГТ; CO_2, холестерин, триглицериды

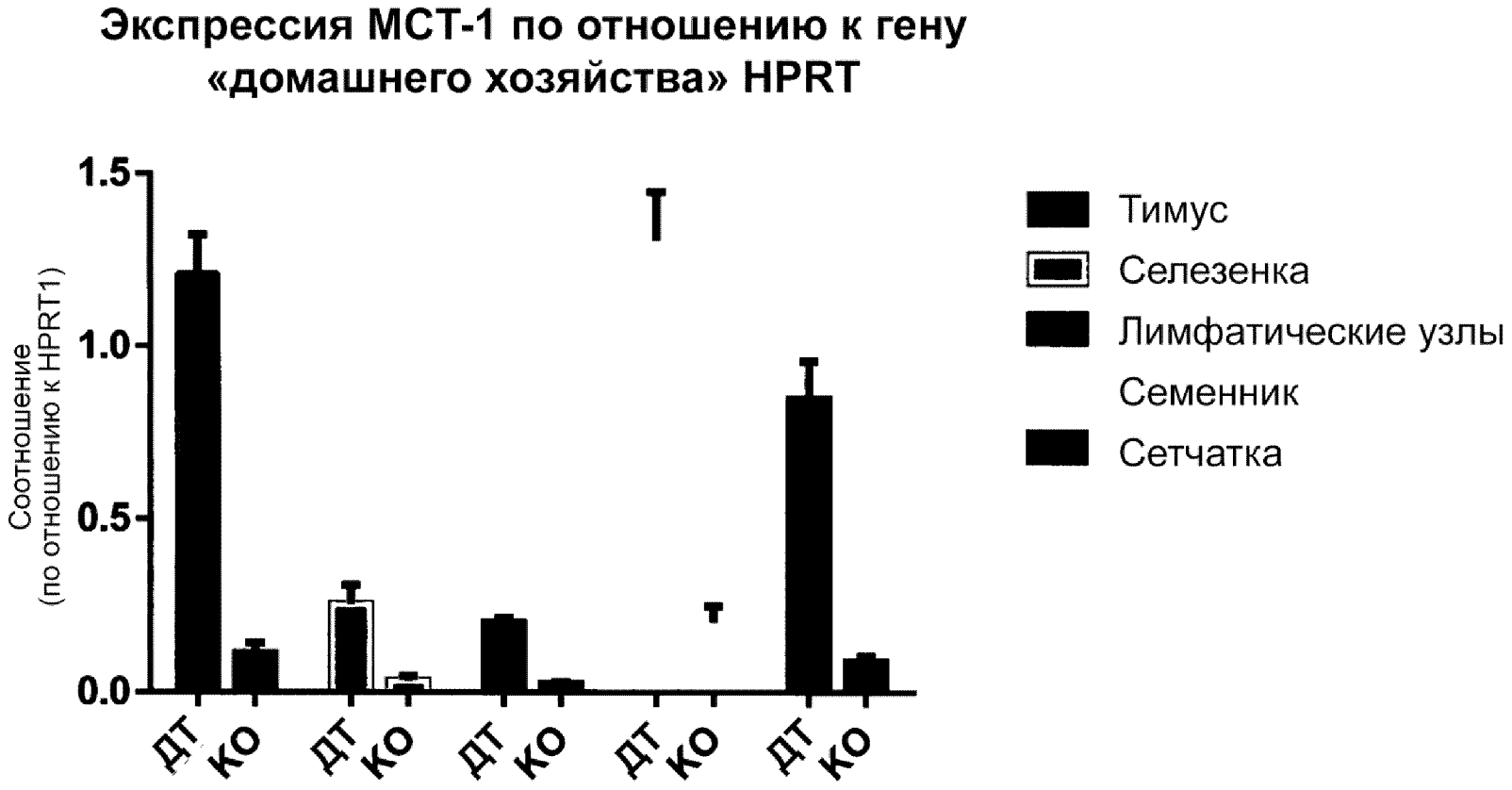


Фиг. 27. **Показатели клинической биохимии, макроскопическое исследование и результаты гистопатологического исследования**

- В тканях, требуемых по протоколу, изменений не наблюдается, за исключением семенников
  - Глаза со зрительным нервом, семенники, сердце, скелетные мышцы (длинный разгибатель пальцев, камбаловидная мышца, поясничная мышца, диафрагма)
  - В оцениваемых параметрах клинической биохимии отсутствуют изменения, ассоциированные с генотипом

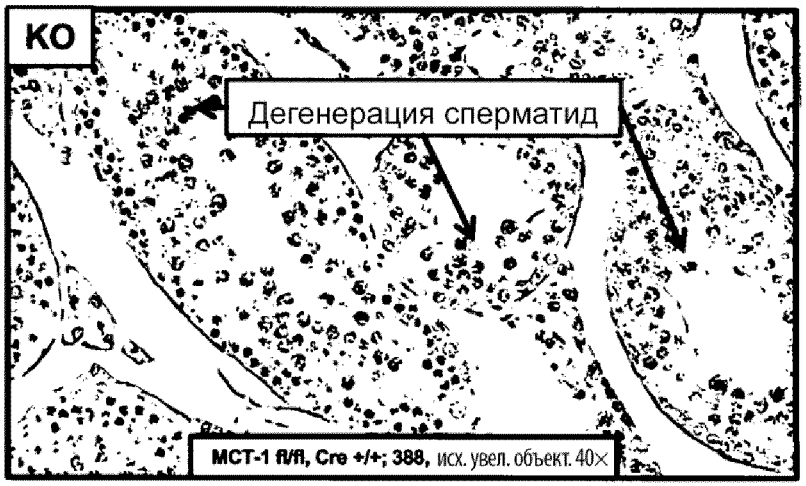
- Семенники животных MCT-1 KO
  - Все животные имели результат макроскопического исследования «Семенники, малый размер» (n = 4)
  - Все животные имели результат микроскопического исследования «Семенники, дегенерация сперматид, выраженная» (n = 4)

Фиг. 28. **У мышей MCT1 KO обеспечивается устойчивый индуцированный тамоксифеном нокдаун экспрессии MCT1 в целевых тканях**

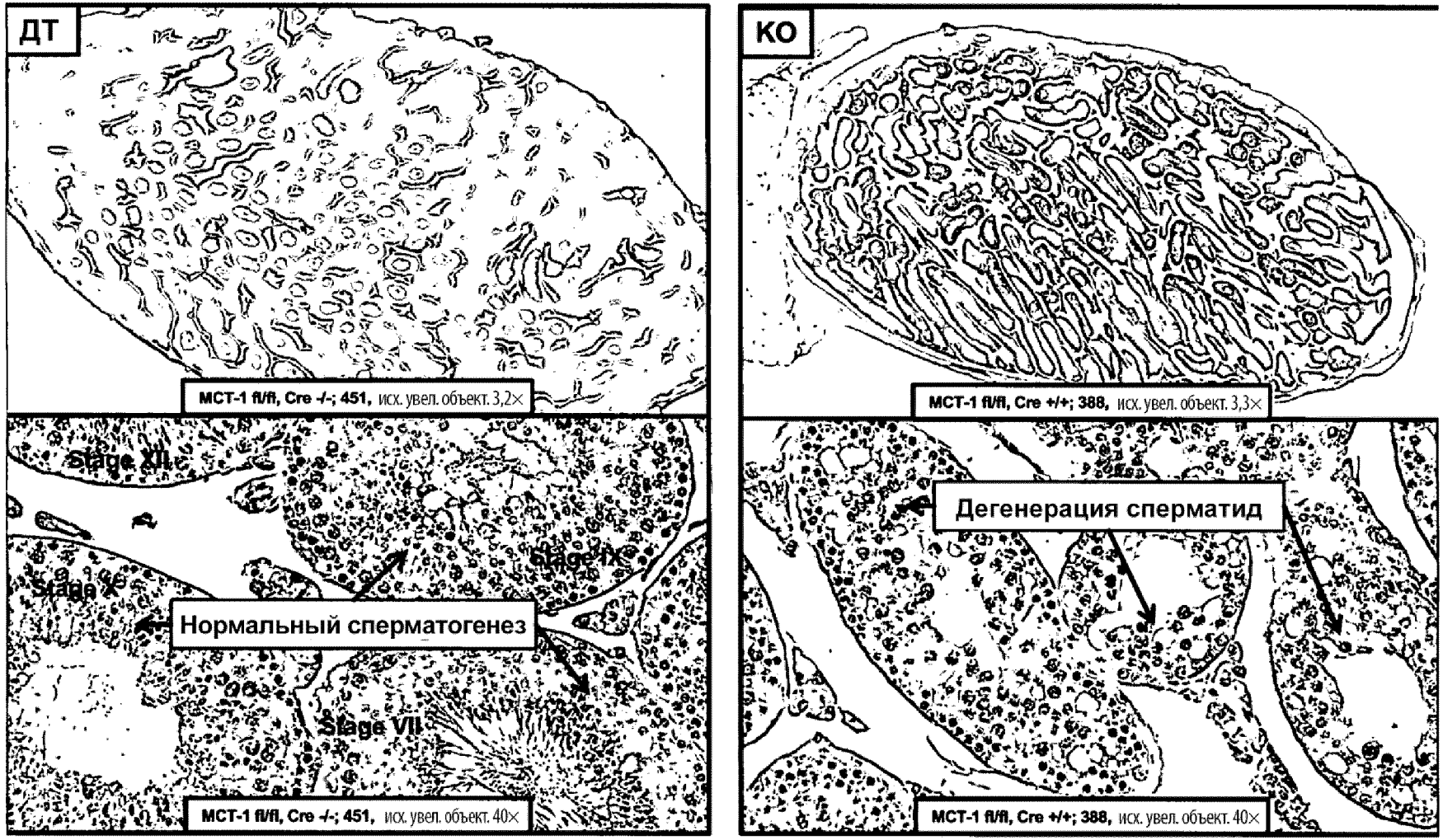


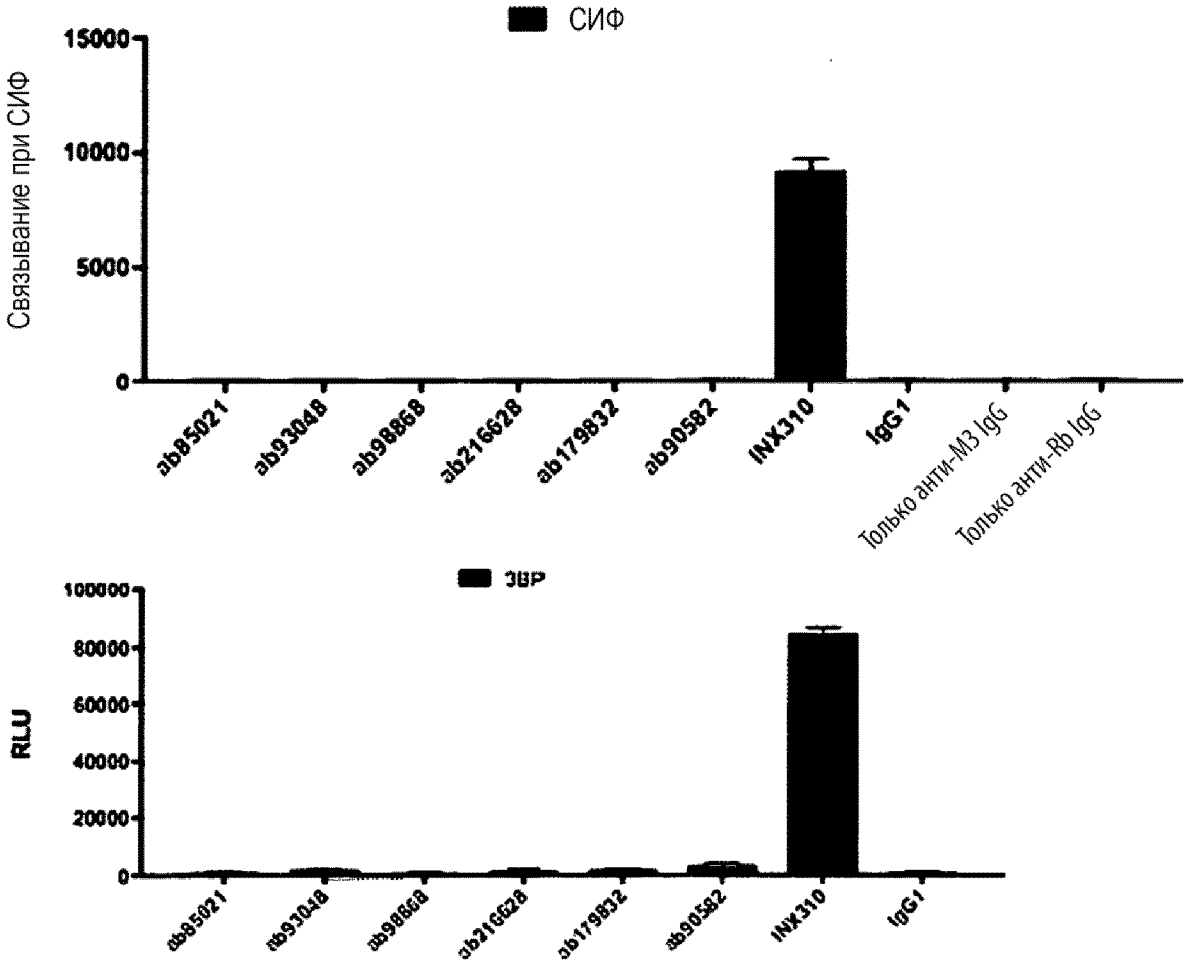
Фиг. 29. **Наблюдаемые условные изменения в семеннике только у КО**

- Целевое фенотипирование тканей от мышей МСТ-1 ДТ и гетерозиготных по МСТ-1 мышей КО
- Выраженная дегенерация сперматид, наблюдаемая в семенниках всех мышей с нокаутом МСТ-1 (отсутствие сперматид и сперматоцитов поздних стадий, сниженная целлюлярность канальцев, вакуолизация и клеточные остатки)
  - Коррелирует с результатом макроскопического исследования семенников малого размера
  - Эффективный нокдаун МСТ-1 в семенниках на основе ПЦР
  - Отсутствие других ассоциированных с генотипом изменений параметров клинической биохимии в тканях согласно протоколу
- Вывод: Макроскопические и гистологические изменения семенников в исследованиях токсичности связаны с МСТ-1 (как и ожидалось)



Фиг. 30. **Сравнение семенников ДТ с семенниками МСТ-1 КО**

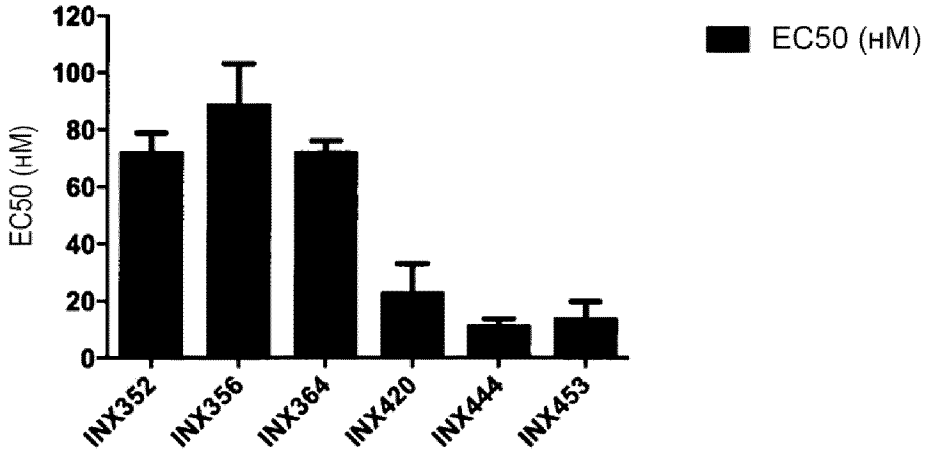



СИФ
Связывание при СИФ
15000
10000
5000
0
ab85021
ab93048
ab98868
ab216628
ab179832
ab90582
INX310
IgG1
Только анти-M3 IgG
Только анти-Rb IgG
ЗВР
RLU
100000
80000
60000
40000
20000
0
ab85021
ab93048
ab98868
ab216628
ab179832
ab90582
INX310
IgG1

Фиг. 31

Фиг. 32. **Антагонистическая активность различных анти-MCT1 антител**

Функциональный анализ с использованием бромпирувата: Антитела серий INX300 и INX400



INX420, INX444 и INX453 выбирали из 48 антител на основе функционального разнообразия и разнообразия последовательности

Фиг. 33. **Выравнивание анти-MCT1 VH**

Примечания:

- CDR выделены жирным шрифтом, изменения (по отношению к CDR3) от исходного выделены красным цветом
- Изменения каркасов выделены прямоугольниками

```
INX420_VH    QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTEYN    60
INX444_VH    QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTEYN    60
INX453_VH    QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTEYN    60
INX356_VH    QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTEYN    60
INX352_VH    QVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWVRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTEYN    60
INX364_VH    QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYHLQWIRQPPGKGLEWIGFIRSSGNTEYN    60
             ****:*********:********************:***********************

INX420_VH    PSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRFVHGTWYSPGYYLMDAWGQGT    120
INX444_VH    PSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARKRWVHGTWYSPGYYVMDAWGQGT    120
INX453_VH    PSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNRWVQGWWYSPGYYLMDAWGQGT    120
INX356_VH    PSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDAWGQGT    120
INX352_VH    PSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDAWGQGT    120
INX364_VH    PSLKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSWYHGTYYSPGYYVMDAWGQGT    120
             ************************************: : :* :******:********

INX420_VH    LVTVSS        126
INX444_VH    LVTVSS        126
INX453_VH    MVTVSS        126
INX356_VH    MVTVSS        126
INX352_VH    LVTVSS        126
INX364_VH    LVTVSS        126
             :*****
```

Фиг. 34. **Выравнивание анти-MCT1 VL**

Примечания:

- CDR выделены жирным шрифтом, изменения (по отношению к CDR3) от исходного выделены красным цветом
- Изменения каркасов выделены прямоугольниками

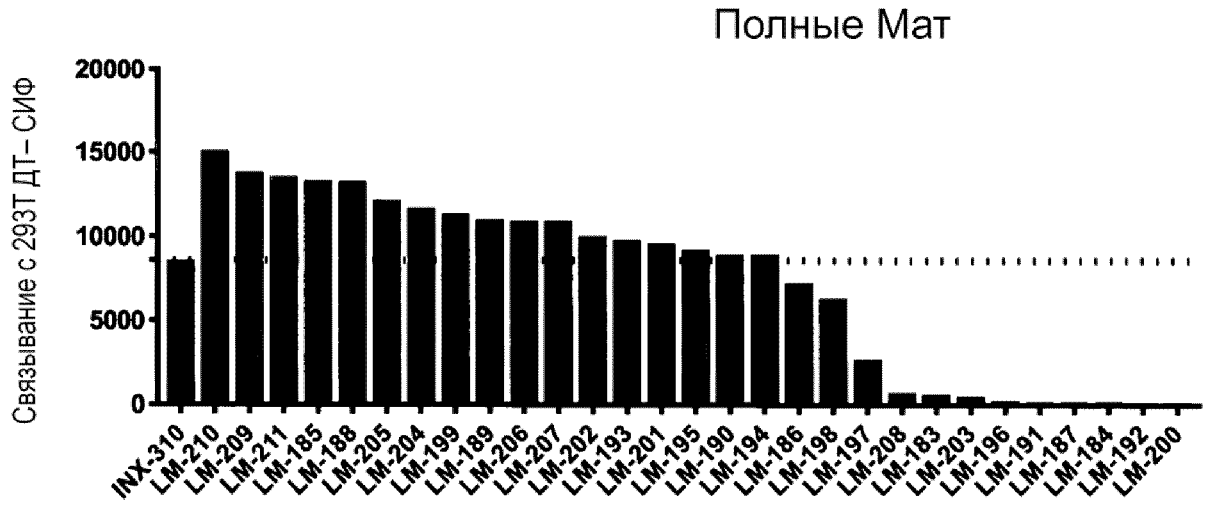
```
INX352|INX356|INX364|INX420_VL   DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRGSQNINNYLAWFQQKPGKTPALLIYNRHNLQSGVPS  60
INX444|INX453_VL                DIQLTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVAS  60
                                ***:*****::******:******.**.*.*****:******:* ****   .***** *

INX352|INX356|INX364|INX420_VL   RFRGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYS-DGYTFGPGTKVDIK    106
INX444|INX453_VL                RFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDILPYTFGQGTKVEIK    107
                                ** * *****:**********.***** * .   **** ****:**
```

Другие функциональные MCT1-связывающие Ат

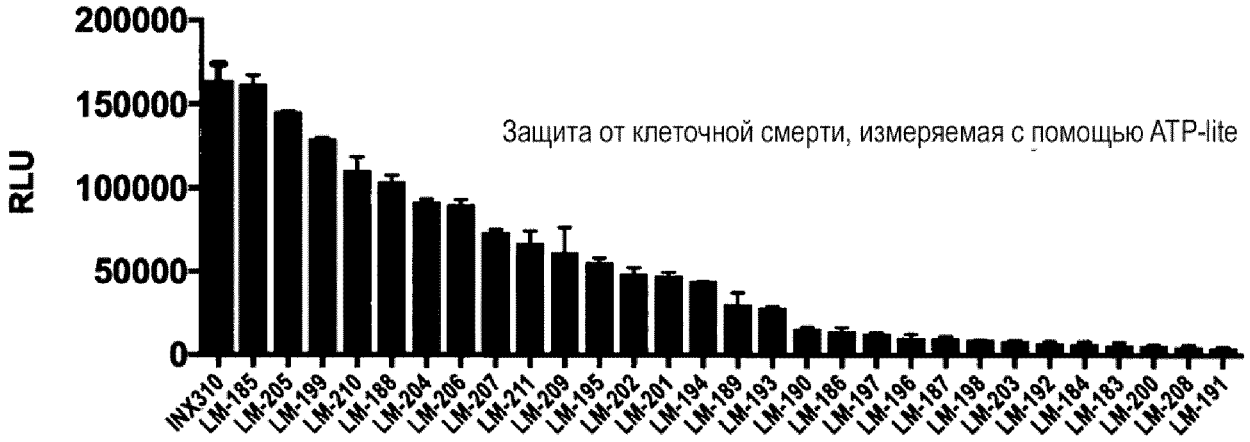
Фиг. 35A

Связывание MCT1+ 293T клеток



Фиг. 35B

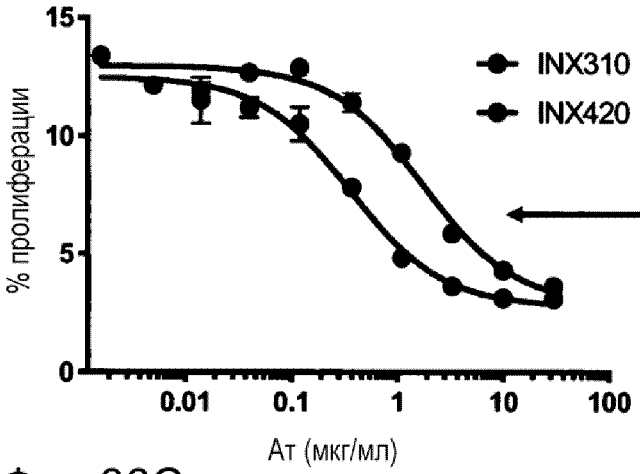
Функция в анализе транспорта токсина бромпирувата



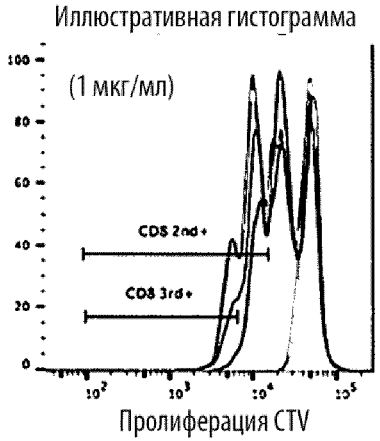
ОЕЛ = относительная люминесценция

INX420 имеет однозначную нМ активность в функциональном анализе

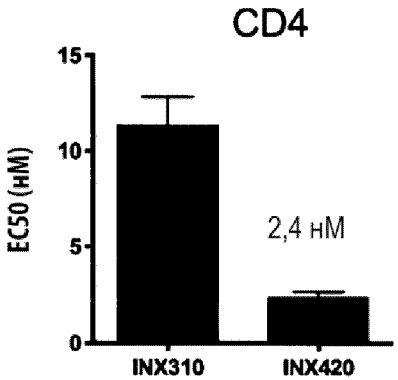
Фиг. 36A



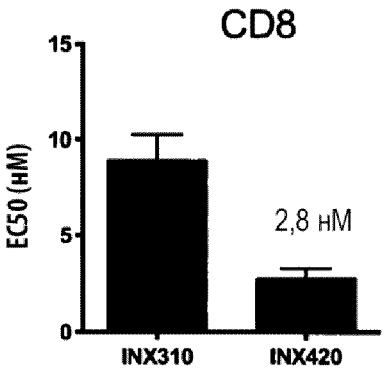
Фиг. 36B



Фиг. 36C



Фиг. 36D



Среднее EC50 от шести доноров

INX420 повышает частоту PD1+ TIGIT+ клеток *in vitro*

Фиг. 37A

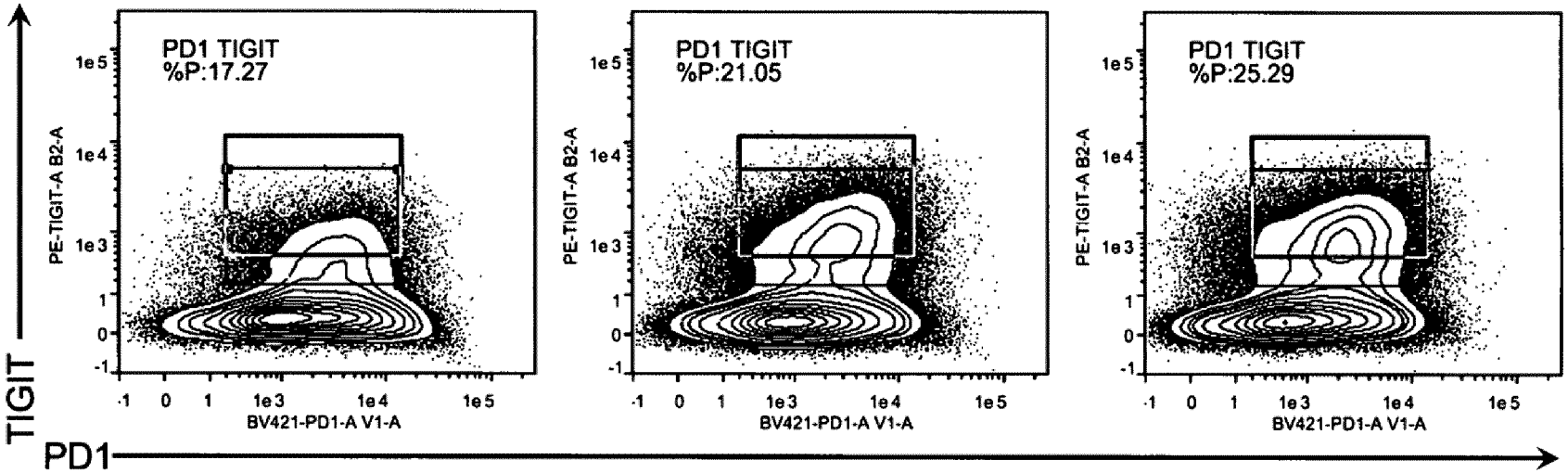
CD3/CD28 без Ат

Фиг. 37B

CD3/CD28 +SMi

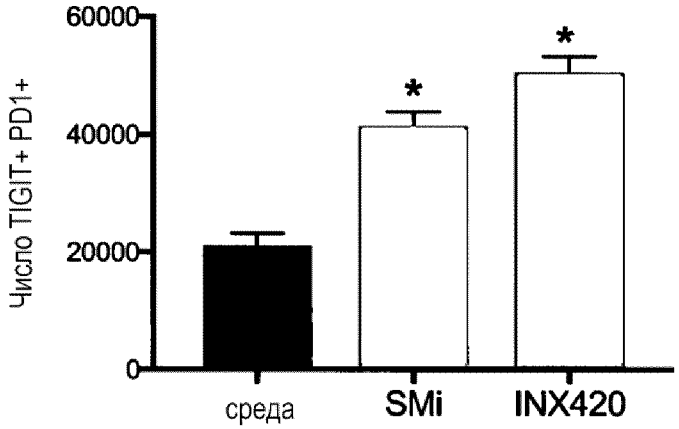
Фиг. 37C

CD3/CD28 + INX420



Число клеток TIGIT+ PD1+

SMi = AZ3965 200 нМ
INX420= 10 мкг/мл

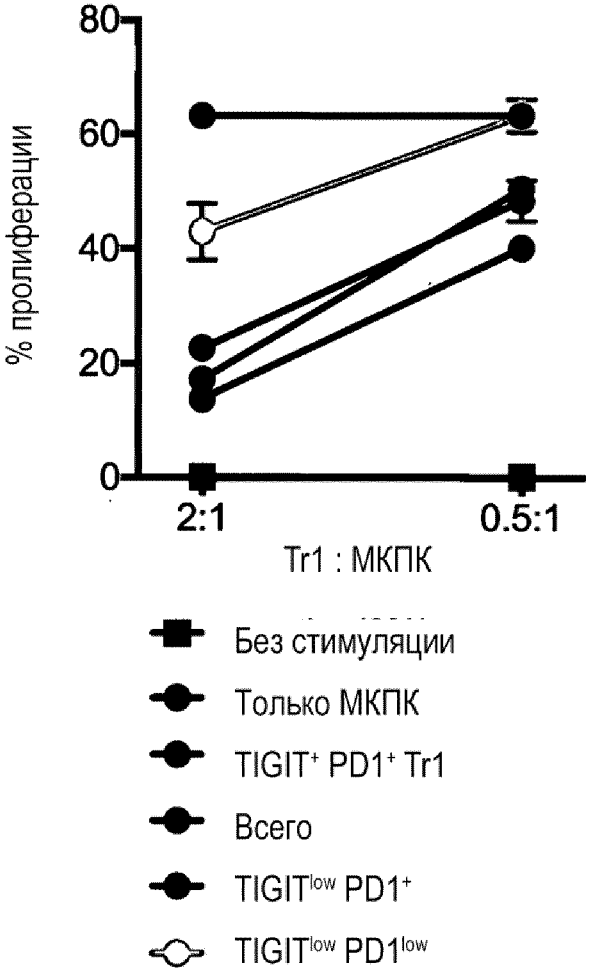


Фиг. 37D

TIGIT+ PD1+ Tr1-клетки подавляют пролиферацию МКПК

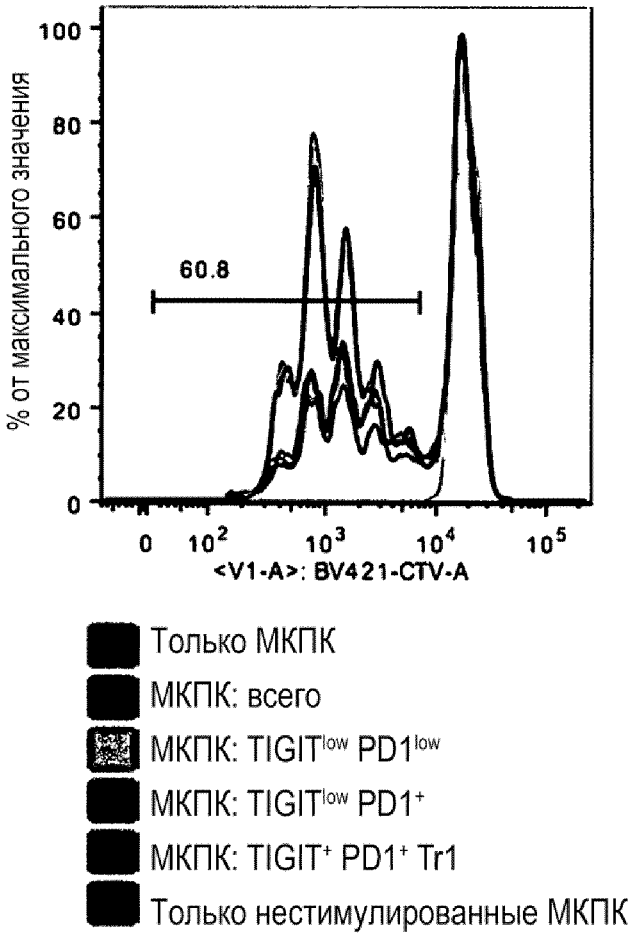
Фиг. 38A

Супрессия



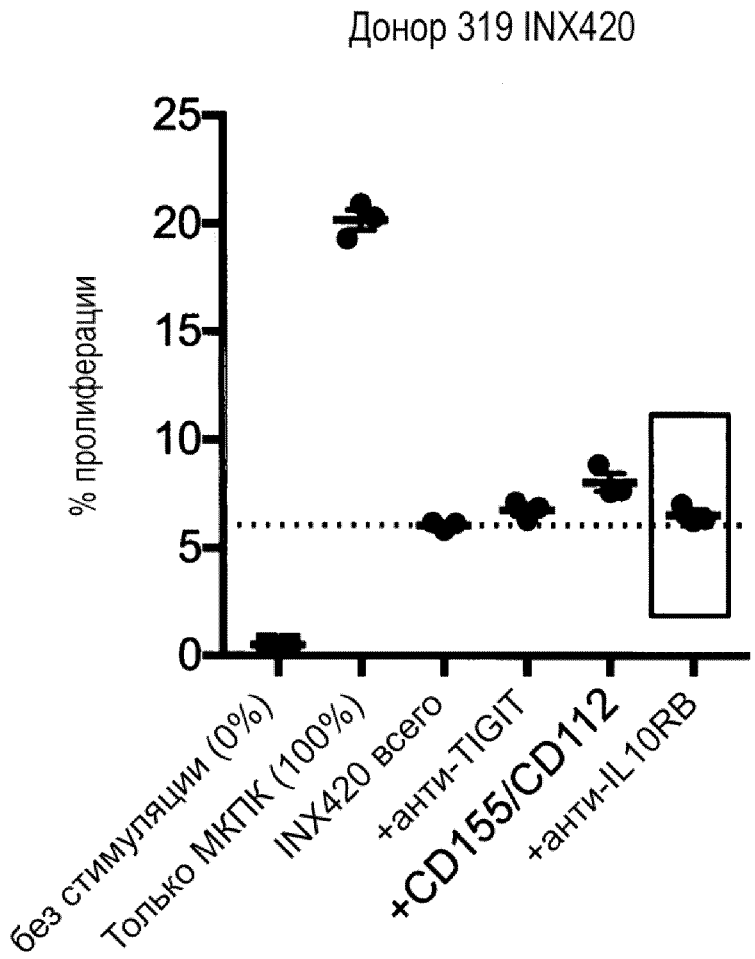
Фиг. 38B

Иллюстративная диаграмма проточной цитометрии (0,5:1)



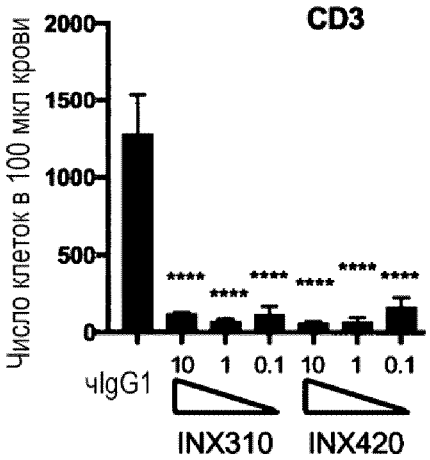
Блокирование передачи сигнала ИЛ10 не нарушает Tr1-опосредованную супрессию

Фиг. 39

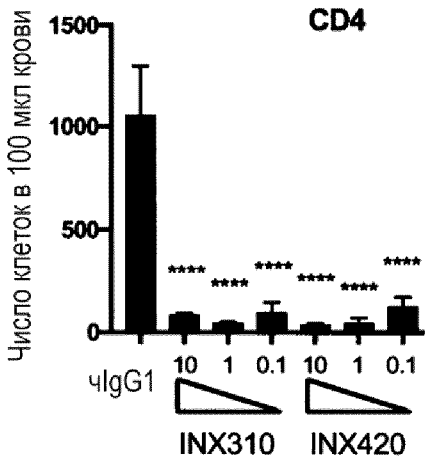


Обработка анти-MCT1 Ат снижает число эффекторных Т-клеток и повышает частоту Tr1-клеток в модели ксено-GvHD

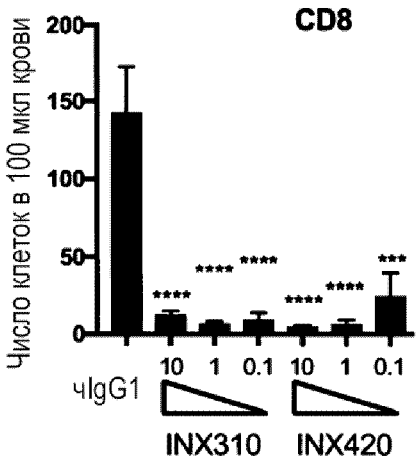
- **Эффекторные Т-клетки (11-е сутки ALC)**



Фиг. 40A



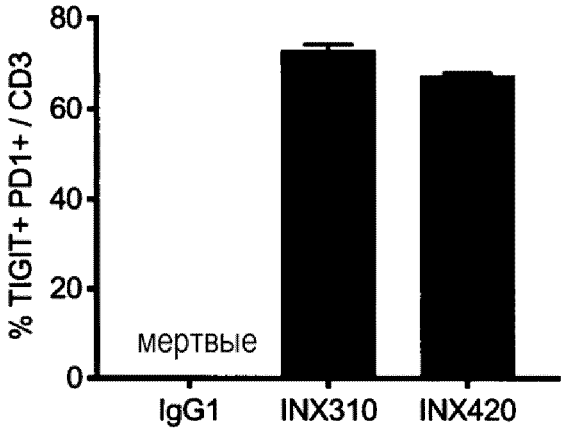
Фиг. 40B



Фиг. 40C

- **Tr1-клетки (36-е сутки*)**

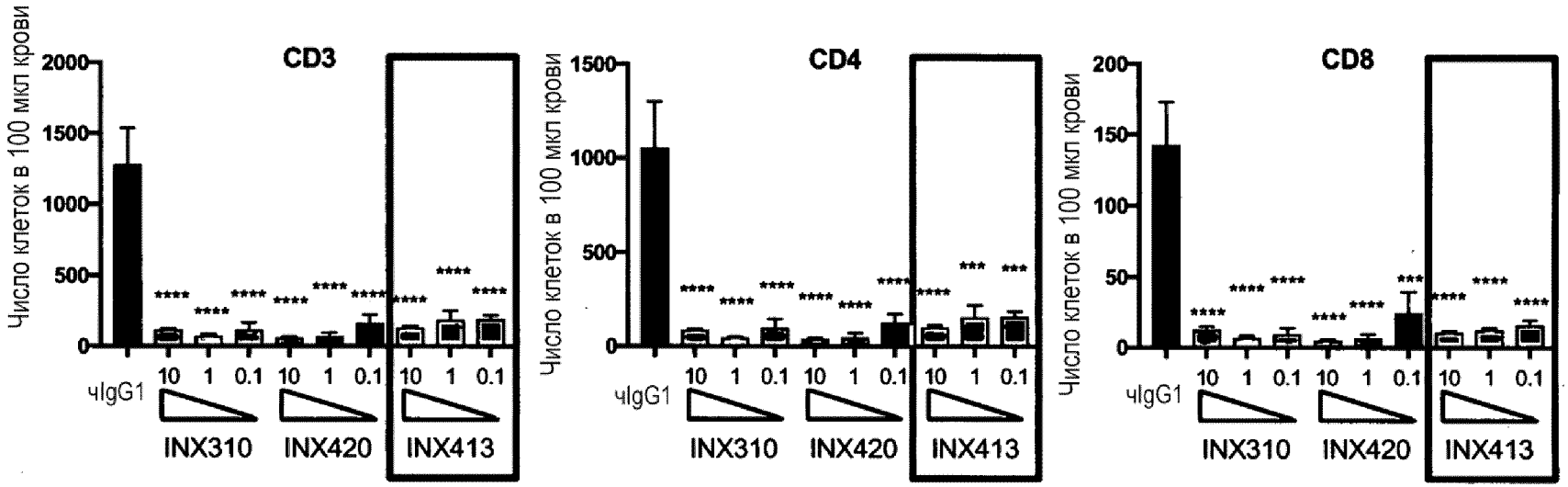
*другой эксперимент



Фиг. 40D

MCT1 антитела подавляют пролиферацию CD3, CD4 и CD8 клеток в модели ксено-GvHD

- **Эффекторные Т-клетки** (11-е сутки ALC)



Фиг. 41A

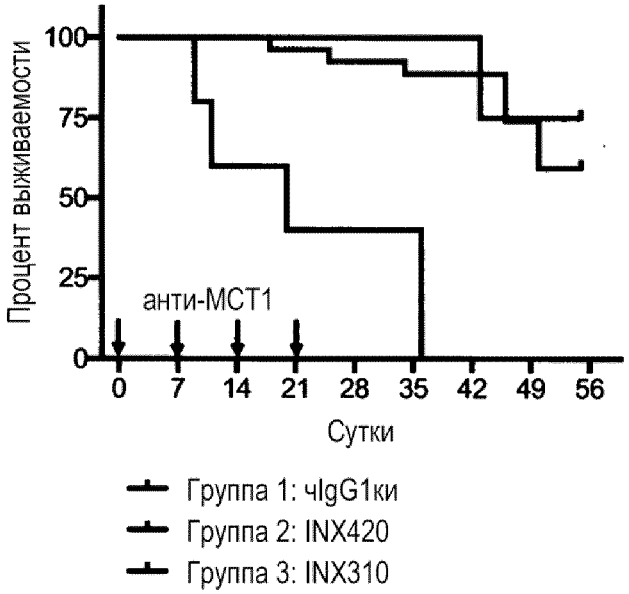
Фиг. 41B

Фиг. 41C

Анти-MCT1 Ат вызывают толерантность в модели ксено-GvHD

Фиг. 42A

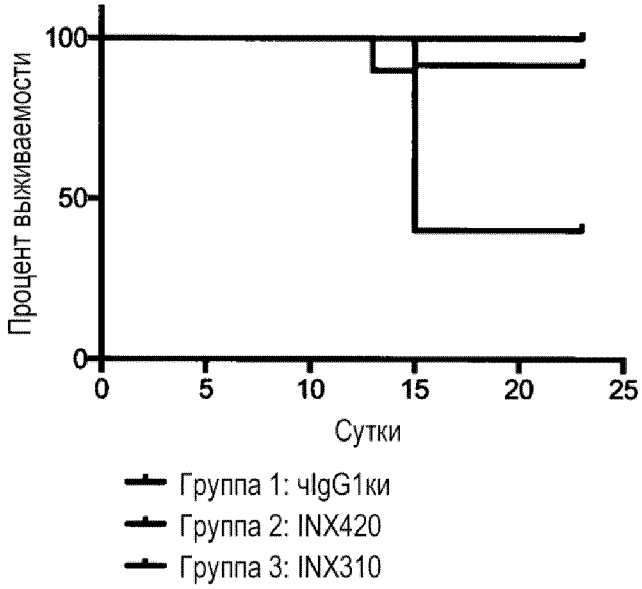
Долговременная защита



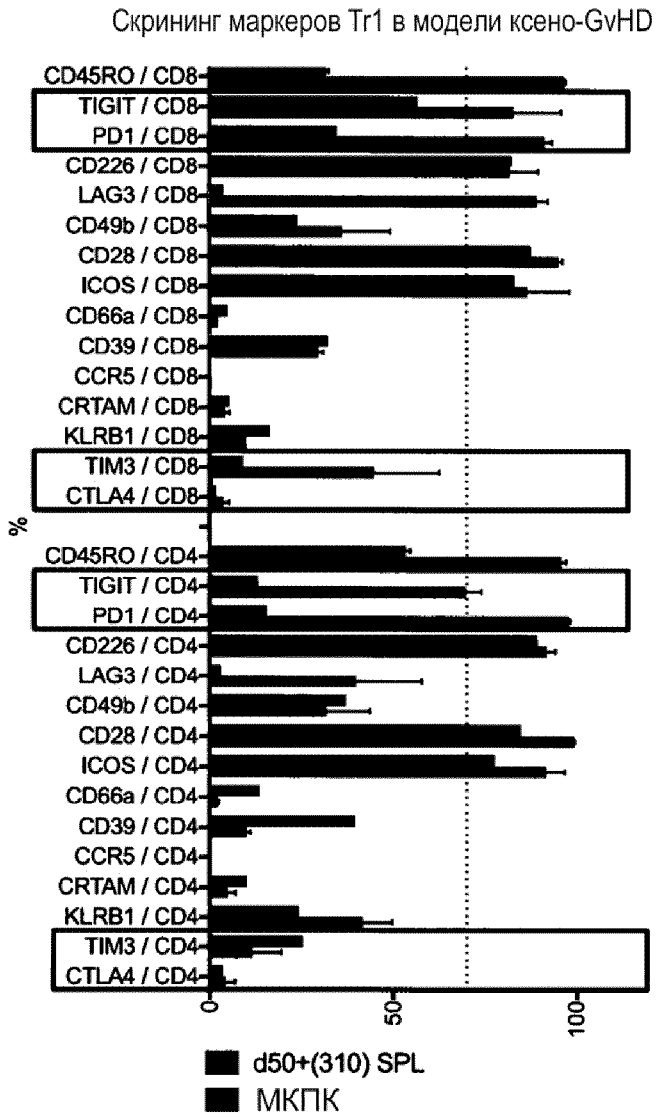
Повторное введение на д42 МКПК от **того же** донора

Фиг. 42B

Индукция толерантности



TIGIT и PD1 представляют собой предположительные биомаркеры Tr1

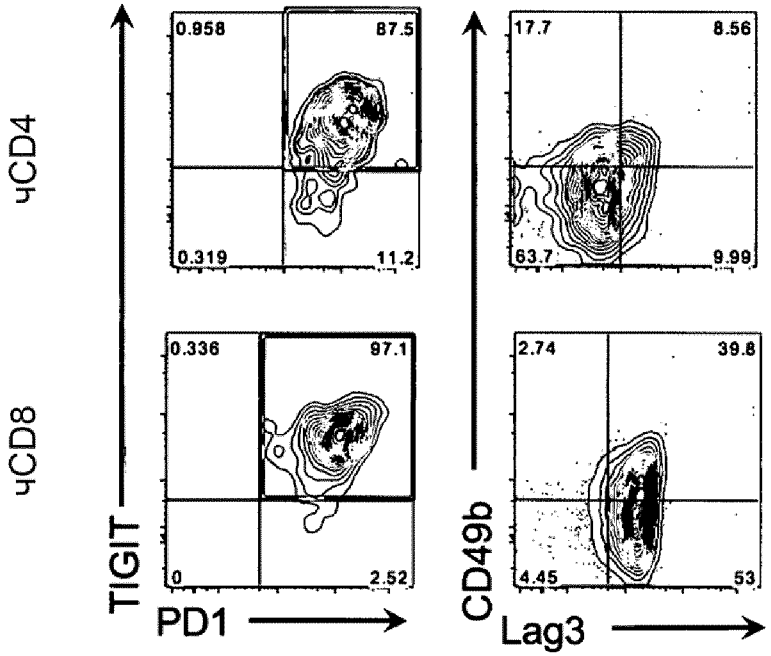


- TIGIT и PD1 экспрессируются на свыше 75% Т-клеток человека в модели ксено-GvHD
- Другой иммунный регулятор не соответствует указанному паттерну

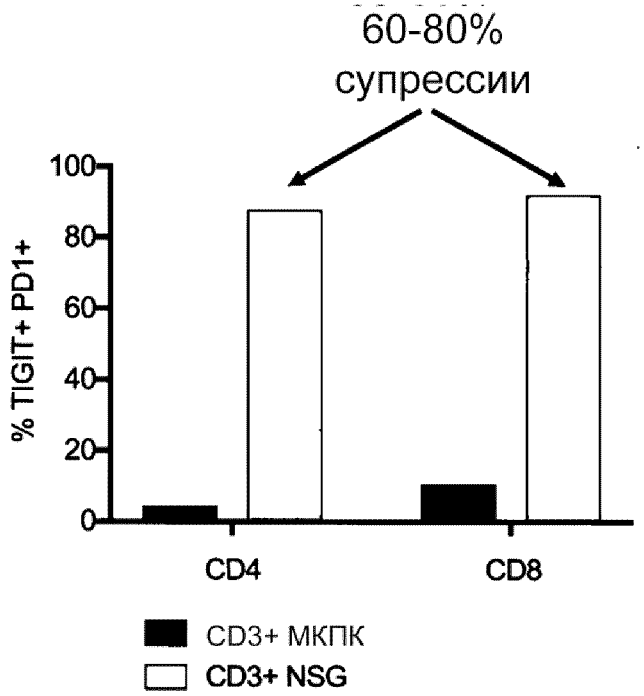
Фиг. 43

TIGIT и PD1 представляют собой предположительные маркеры Tr1

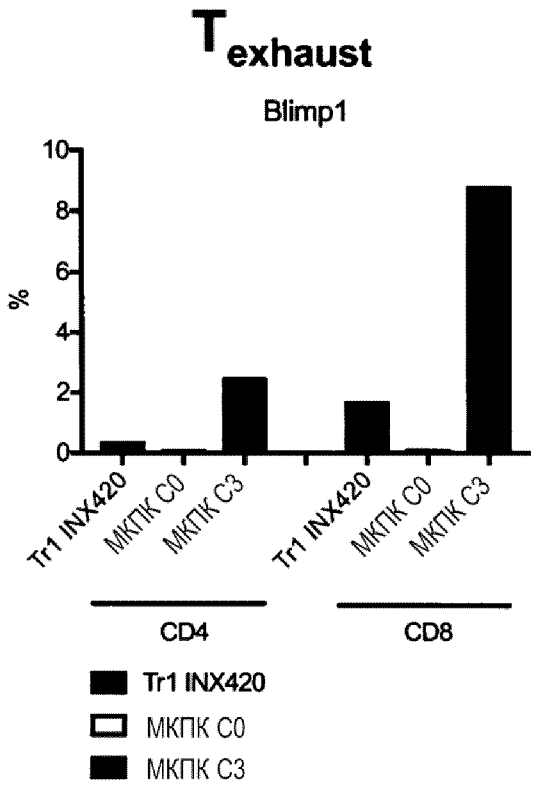
Фиг. 44A



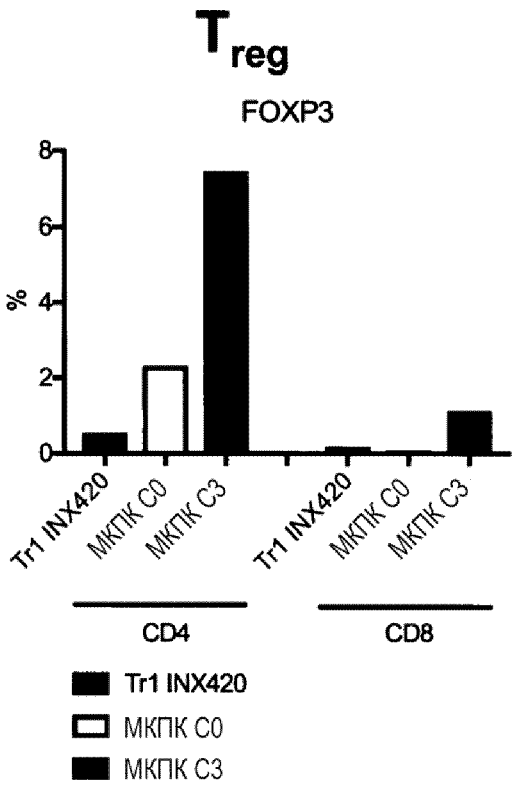
Фиг. 44B



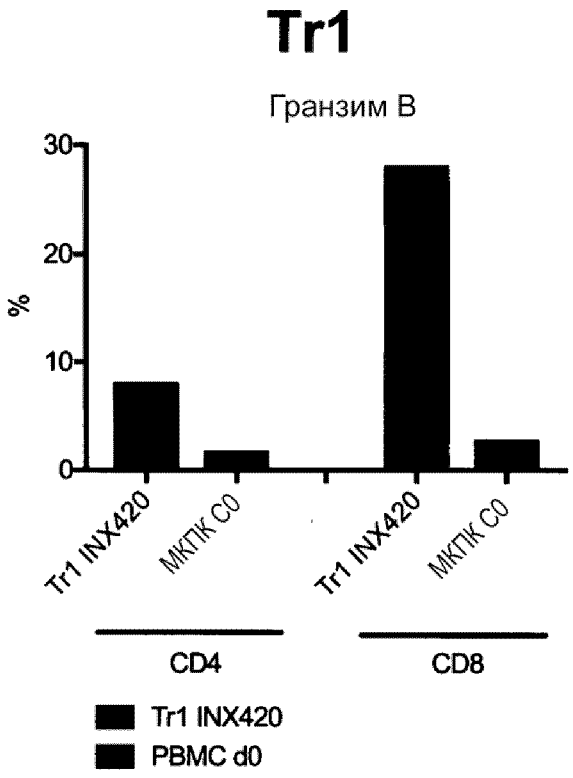
Tr1 экспрессируют высокие уровни гранзима B, но не FOXP3 или Blimp1



Фиг. 45A

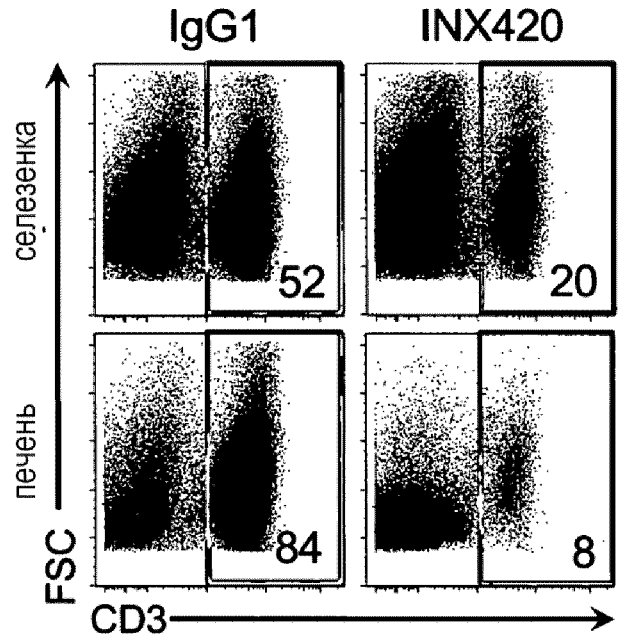


Фиг. 45B



Фиг. 45C

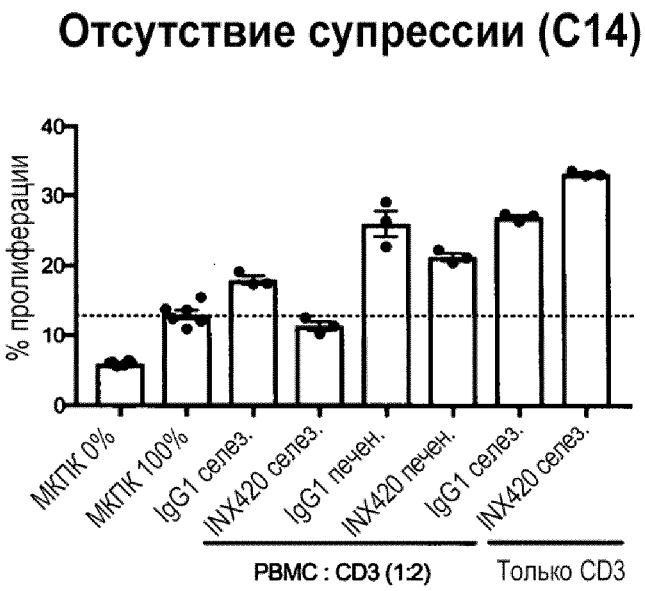
14-е сутки: у мышей NSG имеется значительное количество эффекторных клеток



Фиг. 46A

	иммунные клетки, число миллионов/орган	чCD3 (%)	чCD3, число миллионов/орган
IgG1 селезенки	8	52	4
INX420 селезенки	10	20	2
IgG1 печени при патологии	**18**	**84**	**15**
IgG1 печени без патологии	4	49	2
INX420 печени	3	30	1

Фиг. 46B

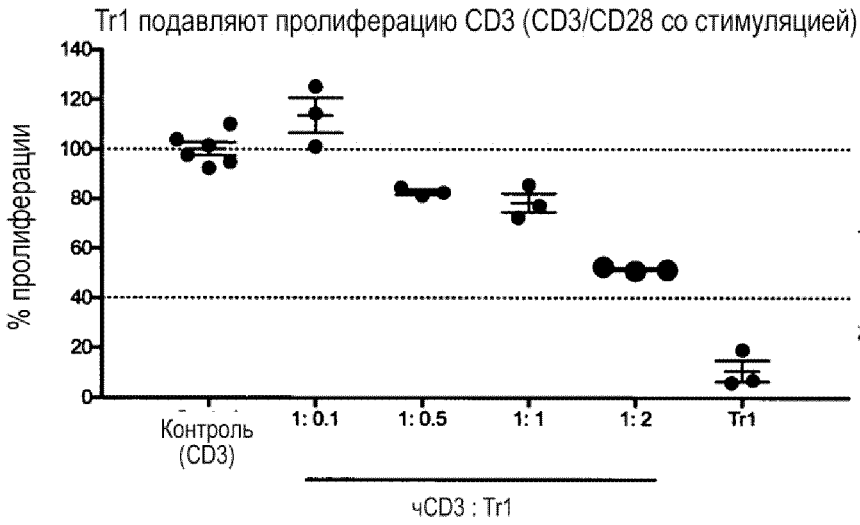


Фиг. 46C

Tr1 подавляют пролиферацию в чCD3+ клетках

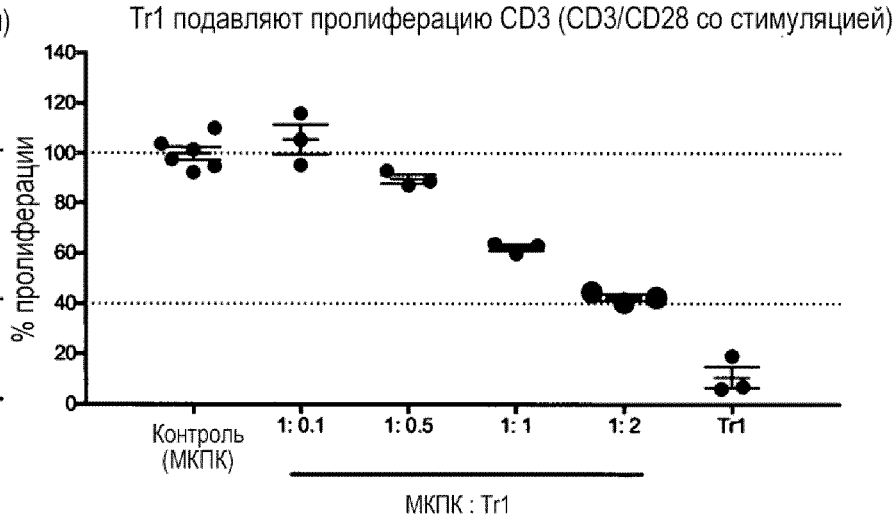
C109 ~60% супрессии

чCD3



Фиг. 47A

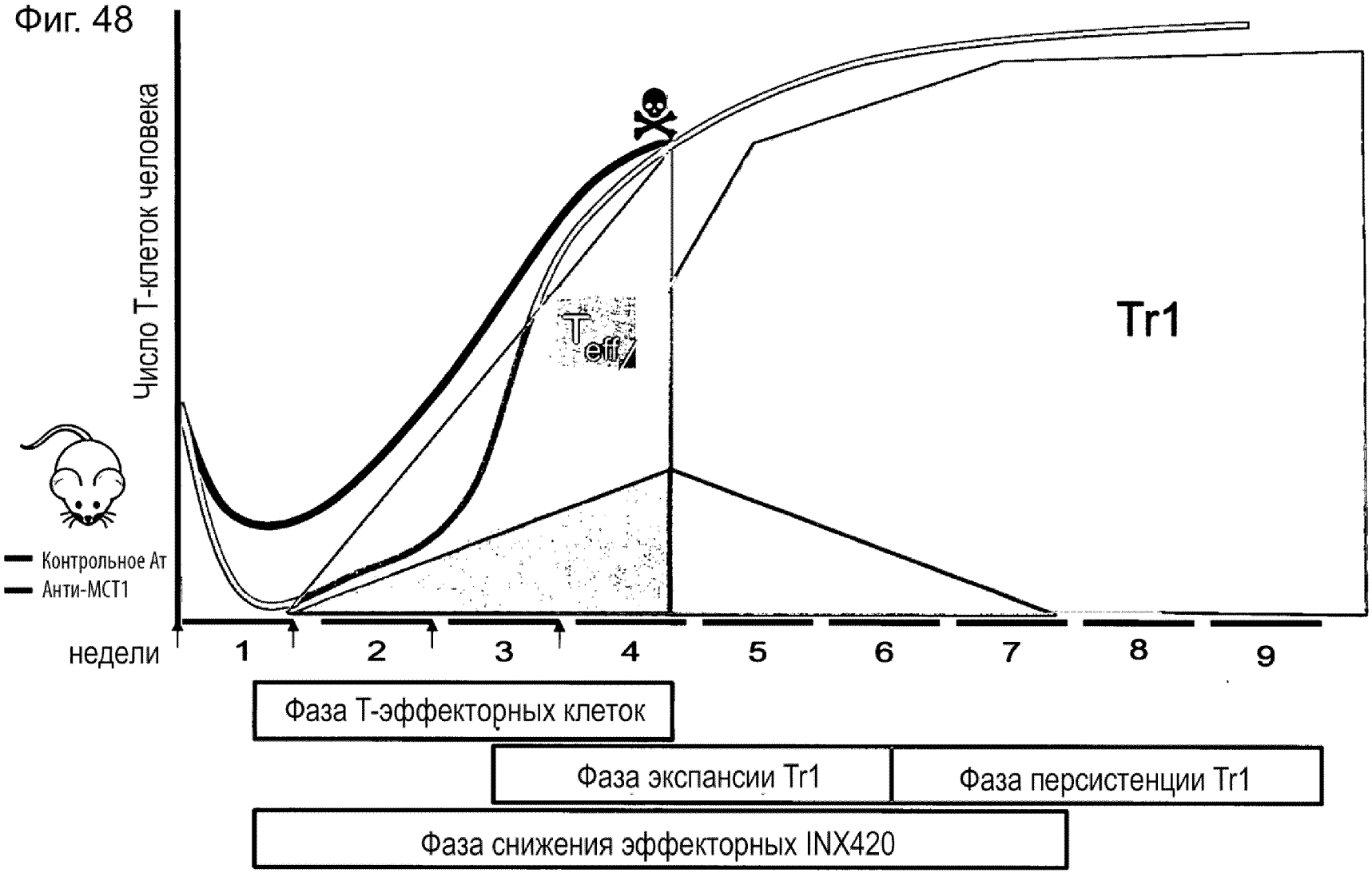
Всего МКПК



Фиг. 47B

Кинетика образования Tr1 в модели ксено-GvHD

Фиг. 48

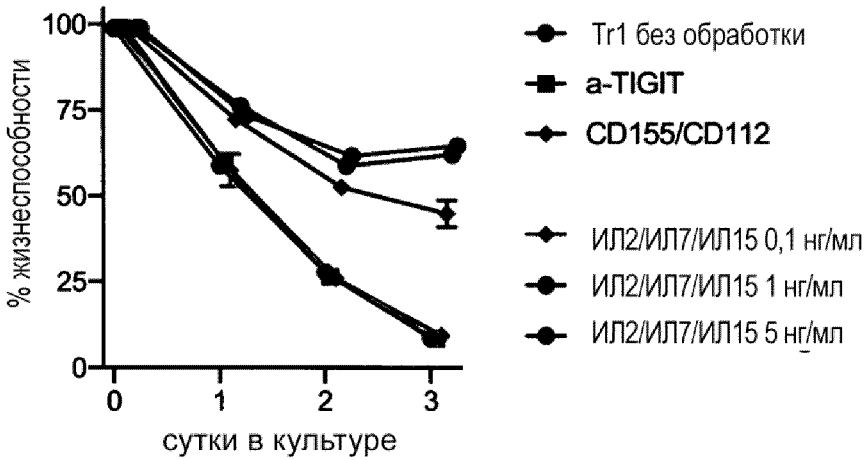


Факторы выживаемости Tr1 *ex vivo*

- Уничтожение целевых клеток не представляет собой механизм супрессии Tr1
- Tr1 выживают при кокультивировании с целевыми клетками, однако погибают при культивировании в отдельности

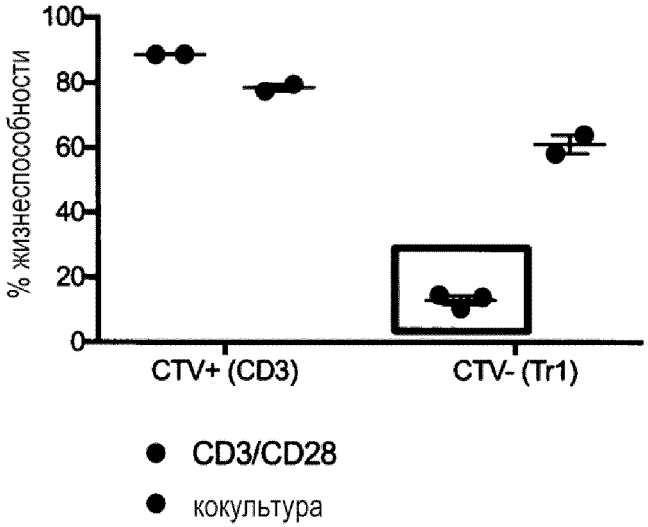
Фиг. 49A

Выживаемость Tr1 (ex vivo)



Фиг. 49B

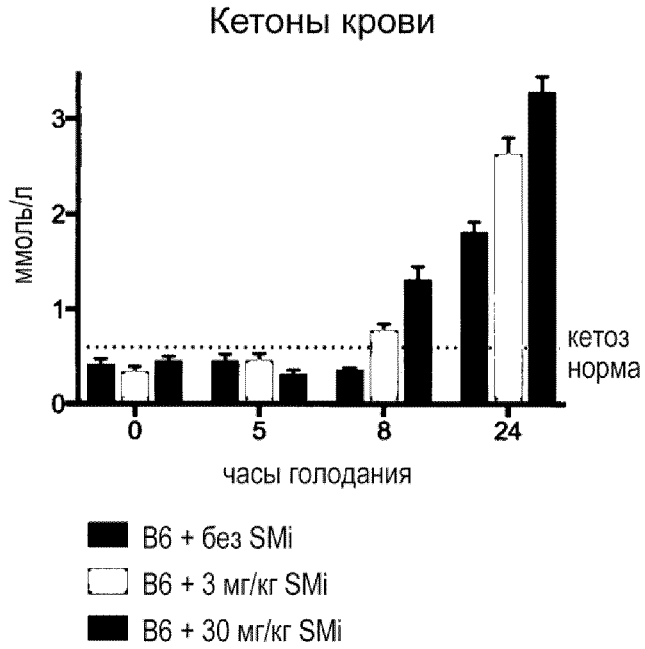
Жизнеспособность CD3 : Tr1



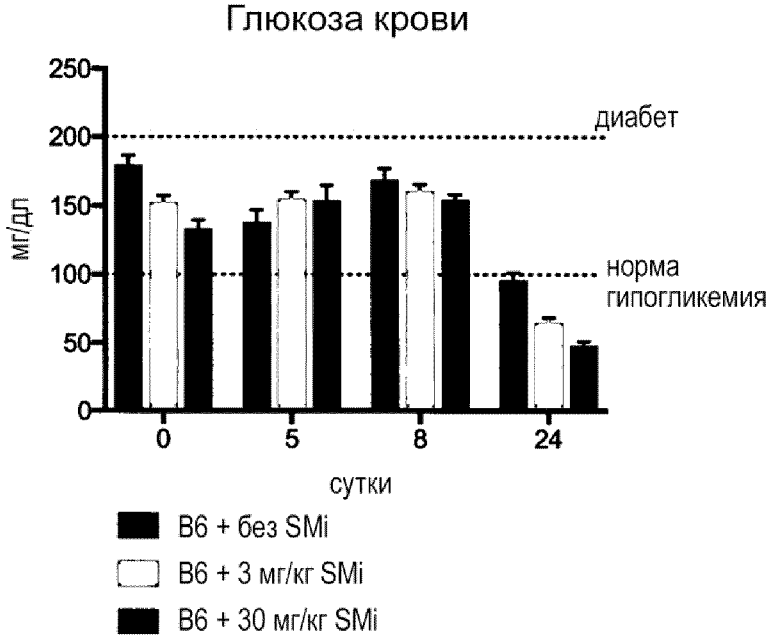
- Анти-TIGIT Ат или лиганды к PVR не повышают выживаемости Tr1 ex vivo
- ИЛ2+ИЛ7+ИЛ15 повышает выживаемость Tr1 ex vivo дозозависимым образом, достигая ~75%

SMi-обусловленный кетоз наблюдается через 8 ч после голодания

Фиг. 50A



Фиг. 50B

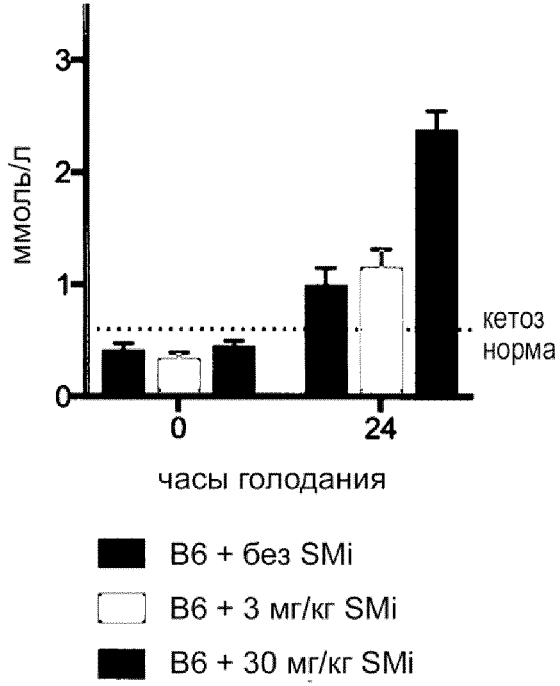


- 8-24 ч, но не 5 ч голодания активирует кетоз, потенциируемый MCT1 низкомолекулярным ингибитором (Smi)
- SMi-обусловленный кетоз происходит после гипогликемии при голодании (см. 8 ч)
- Обработка SMi потенциирует обусловленный голодание кетоз и гипогликемию

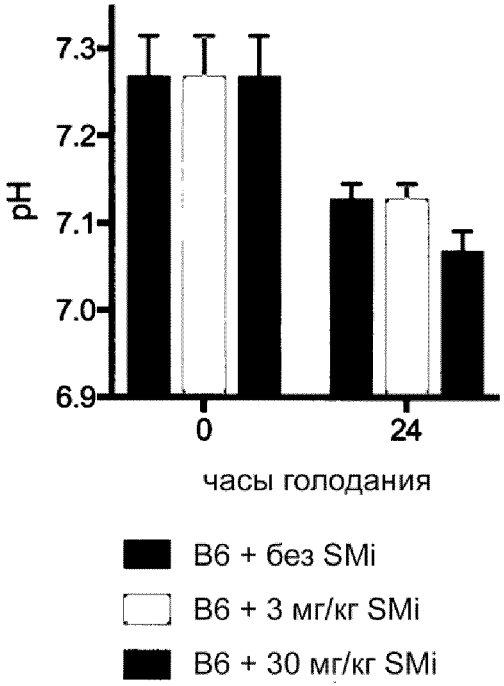
Голодание (24 ч) +/- SMi не активирует кетоацидоз

SMi активирует/потенциирует кетоз

Фиг. 51A Кетоны крови, 0-24 ч



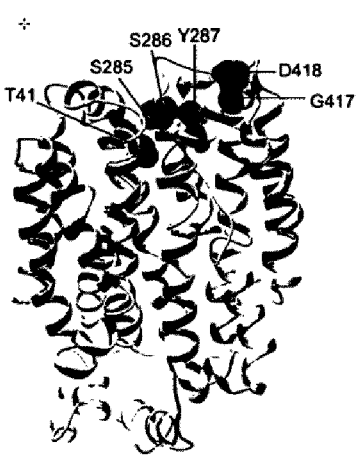
Фиг. 51B pH крови, 0-24 ч



- Наблюдали зависимое от голодания снижение pH (от 7,3 до 7,1, незначительное, <0,2 pH)
- Наблюдали незначительное (~0,05 pH) дополнительное SMi (высокая доза)-зависимое снижение pH

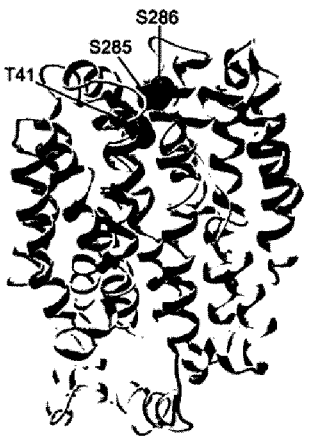
Эпитоп анти-MCT1: структура

INX444



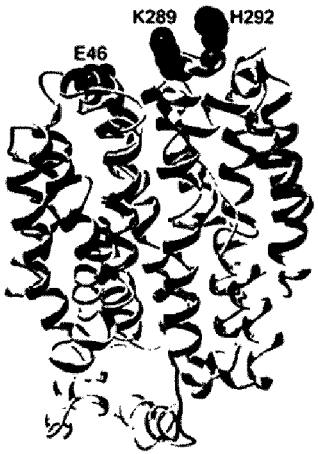
Фиг. 52A

INX420



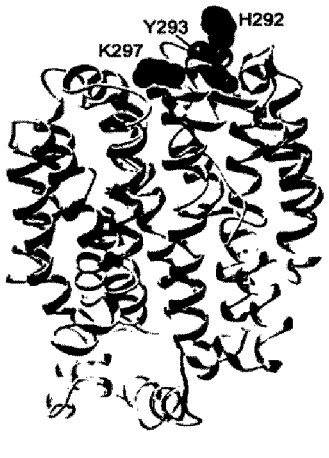
Фиг. 52B

LM183



Фиг. 52C

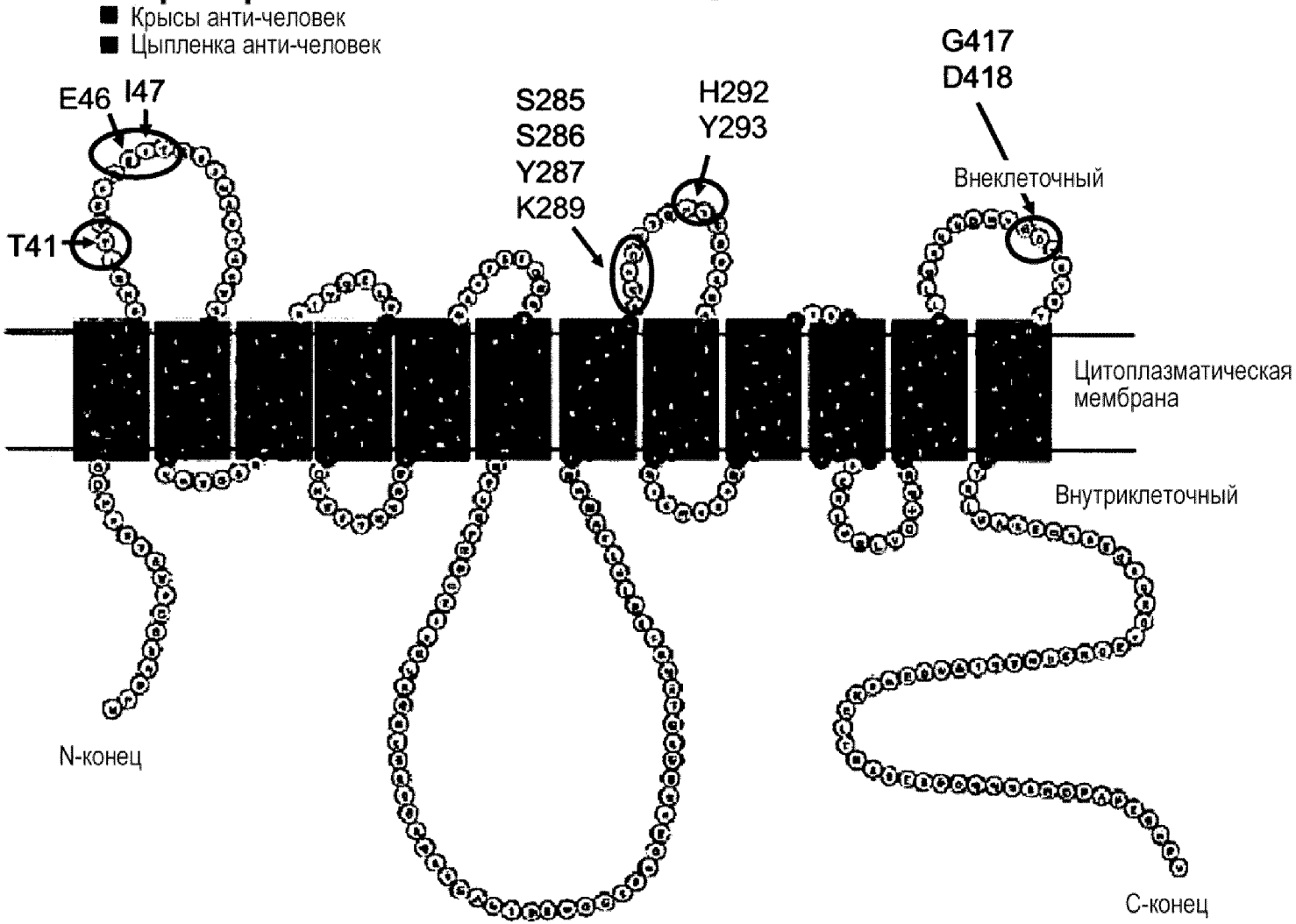
LM186



Фиг. 52D

Фиг. 53

Картирование эпитопа анти-MCT1



Трансмембранный
Цитоплазматический
Внеклеточный

Фиг. 54

■ Крысиное анти-человеч.
■ Цыпленка анти-человеч.

*420 350 мМ NaCl

T41 (20/44)
E46 (83)
I47 (20*)

```
MOT1_HUMAN   MPPAVGGPVG YTPPD                  TVFFKEIEGI FHATTSEVSW ISSIMLAVMY GGGPISSILV NKYGSRIVMI VGGCLSGCGL IAASFCNTVQ QLYVCIGVIG 120
MOT1_MOUSE   MPPAIGGPVG YTPPDGGWGW AVLVGAFISI GFSYAFPKSI TVFFKEIEVI FSATTSEVSW ISSIMLAVMY AGGPISSILV NKYGSRPVMI AGGCLSGCGL IAASFCNTVQ ELYLCIGVIG 120
MOT1_RAT     MPPAIGGPVG YTPPDGGWGW AVVVGAFISI GFSYAFPKSI TVFFKEIEII FSATTSEVS                      NKYGSRPVMI AGGCLSGCGL IAASFCNTVQ ELYFCIGVIG 120
I7GN62_MACFA MPPAVGGPVG YTPPDGGWGW AVVIGAFISI GFSYAFPKSI TVFFKEIESI FHATTSEVSW ISSIMLAVMY GGGPISSILV NKYGSRIVMI IGGCLSGCGL IAASFCNTVQ ELYFCIGSVG 120
             ****:***** ********** **::****** ********** ******** * * ******** ********** .********* ****** ***  ********* ********** :**.*** :*
```

```
MOT1_HUMAN   GLGLAFNLNP ALTMIGKYFY KRRPLANGLA MAGSPVFLCT LAPLNQVFFG IFGWRGSFLI LGGLLLNCCV AGALMRPIGP KPTKAGKDKS KASLEKAGKS GVKKDLHDAN TDLIGRHPKQ 240
MOT1_MOUSE   GLGLAFNLNP ALTMIGKYFY KKRPLANGLA MAGSPVFLST LAPLNQAFFD IFDWRGSFLI LGGLLLNCCV AGSLMRPIGP EQVKLEKLKS KESLQEAGKS -------DAN TDLIGGSPKG 233
MOT1_RAT     GLGLAFNLNP ALTMIGKYFY KKRPLANGLA MAGSPVFLST LAPLNQAFFG IFGWRGSFLI LGGLLLNCCV AGSLMRPIGP QQGKVEKLKS KESLQEAGKS -------DAN TDLIGGSPKG 233
I7GN62_MACFA GLGLAFNLNP ALTMIGKYFY KRRPLANGLA MAGSPVFLCT LAPLNQVFFG IFGWRGSFLI LGGLLLNCCV AGALMRPIGP KPTKAGKDKS KASLQKAGKS GVKKGRHDAN TDLIGRHPKR 240
             ********** ********** *:******** ********.* ******.**. **.******* ********** **:******* :  *  * ** * **::****        *** *****  **
```

S285 (20/44)
(20/44)
H292 (83/86)
Y293 (86)

```
MOT1_HUMAN   EKRSVFQTIN QFLDLTLFTH RGFLLYLSGN VIMFFGLFAP LVFLSSYGKS QHYSSEKSAF LLSILAFVDM VARPSMGLVA NTKPIRPRIQ YFFAASVVAN GVCHMLAPLS TTYVGFCVYA 360
MOT1_MOUSE   EKLSVFQTIN KFLDLSLFTH RGFLLYLSGN VVMFFGLFTP LVFLSSYGKS KDFSSEKSAF LLSILAFVDM VARPSMGLAA NTKWIRPRVQ YFFAASVVAN GVCHLLAPLS TTYVGFCVYA 353
MOT1_RAT     EKLSVFQTVN KFLDLSLFTH RGFLLYLSGN VVMFFGLFTP LVFLSNYGKS KHFSSEKSAF LLSILAFVDM VARPSMGLAA NTRWIRPRVQ YFFAASVVAN GVCHLLAPLS TTYVGFCIYA 353
I7GN62_MACFA EKRSVFQTIN QFLDLTLFTH RGFLLYLSGN VIMFFGLFAP LVFLSSYGKS QHYSSEKSAF LLSILAFVDM VARPSMGLVA NTKPIRPRIQ YFFAASIVAN GVCHMLAPLS TTYVGFCVYA 360
             ** *****:* :****:**** ********** *:******:* ****.**** :.:******* ********** ********.* **: ****:* ******:*** ****:***** *******:**
```

K289 (83) K297 (86)

```
MOT1_HUMAN   GFFGFAFGWL SSVLFETLMD LVGPQRFSSA VGLVTIVECC PVLLGPPLLG RLNDMYGDYK YTYWACGVVL IISGIYLFIG MGINYRLLAK EQKANEQ-KK ESKEEETSID VAGKPNEVTK 479
MOT1_MOUSE   GVFGFAFGWL SSVLFETLMD LIGPQRFSSA VGLVTIVECC PVLLGPPLLG RLNDMYGDYK YTYWACGVIL IIAGIYLFIG MGINYRLLAK EQKAEEKQKR EGKEDEASTD VDEKPKETMK 473
MOT1_RAT     GVFGFAFGWL SSVLFETLMD LVGPQRFSSA VGLVTIVECC PVLLGPPLLG RLNDMYGDYK YTYWACGVIL IIAGLYLFIG MGINYRLVAK EQKAEEK-KR DGKEDETSTD VDEKPKKTMK 472
I7GN62_MACFA GFFGFAFGWL SSVLFETLMD LVGPQRFSSA VGLVTIVECC PVLLGPPLLG RLSDMYGDYK YTYWACGVVL IISGIYLFIG MGINYRLLAK EQKANEQ-KK ESKEEETSID VAGKPKEVTK 479
             *.******** ********** *:******** ********** ********** **.******* ********:* **:*:***** *******:** ****:*: *: :.**:*:* * *  **::. *
```

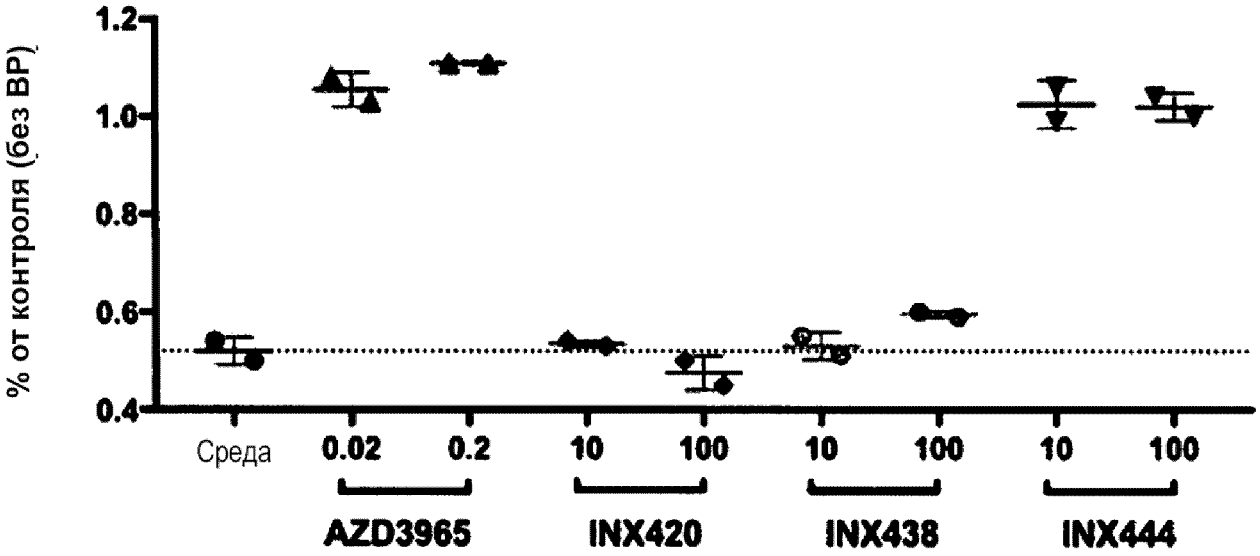
G417 (20*/44)
D418 (20*/44)

```
MOT1_HUMAN   AAESPDQ-KD TDGGPKEEES PV 500
MOT1_MOUSE   AAQSP--QQH SSGDPTEEES PV 493
MOT1_RAT     ETQSPAPLQN SSGDPAEEES PV 494
I7GN62_MACFA AAESPDQ-KD TEEGPKEEDS PV 500
              ::**   :. :. .* **:* **
```

Другие сайты

P37, I40, K45, E48, T55 (петля 1)
Q111 (петля 2)
Q166 (петля 3)
L284, E296, S298 (петля 4)
Y353 (петля 5)
Y419, T422 (петля 6)

Фиг. 55


% от контроля (без ВР)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
Среда
0.02
0.2
10
100
10
100
10
100
AZD3965
INX420
INX438
INX444